

LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM EK148'İN ET PROTEİNLERİ İÇEREN ORTAMDA GAMA AMİNO BÜTİRİK ASİT ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU

Aybike Kamiloğlu*, Habibe Memiş

Bayburt Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bayburt, Türkiye

Geliş/ Received 08.09.2022; Kabul/ Accepted : 02.02.2023; /Online baskı: Published online 15.02.2023

Kamiloğlu, A., Memiş, H. (2023). *Lactiplantibacillus plantarum* EK148'in et proteinleri içeren ortamda gama amino bütirik asit üretimi ve optimizasyonu. GIDA (2023) 48 (2) 271-284 doi: 10.15237/ gida.GD22087

Kamiloğlu, A., Memiş, H. (2023). *Gamma aminobutyric acid production and optimization by Lactiplantibacillus plantarum* EK148 in media containing meat proteins. GIDA (2023) 48 (2) 271-284 doi: 10.15237/ gida.GD22087

ÖZ

Araştırmada, sucuk kaynaklı *Lactiplantibacillus plantarum* EK148 suşu gama amino bütirik asit (GABA) üretim düzeyi açısından değerlendirilmiştir. GABA üretimine, monosodyum glutamat (MSG) bulunmayan besi ortamına glutamik asit kaynağı olarak et protein izolatu edilerek, sıcaklık, pH ve fermantasyon süresi faktörlerinin etkisi değerlendirilmiştir. Deneysel tasarımda elde edilen sonuçlarla *L. plantarum* EK148 suşu için optimum koşullar % 10 protein ekstraktı konsantrasyonu, 33.3 °C sıcaklık, pH 5.05 ve 96 saat fermantasyon süresi olarak belirlenmiştir. Model ile *L. plantarum* EK148 suşu kullanılarak elde edilen veriler arasındaki uyum eksikliğinin önemsiz olduğu, protein ekstraktı konsantrasyonu ve sıcaklığın GABA üretimi üzerine önemli düzeyde etkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile et proteinlerinin glutamik asit kaynağı olarak kullanımı sağlanmış ve MSG içermeyen ortamda *L. plantarum* EK148 suşu kullanılarak GABA üretimi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: GABA, *Lactiplantibacillus plantarum*, YYY, optimizasyon, MSG

GAMMA AMINOBUTYRIC ACID PRODUCTION AND OPTIMIZATION BY LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM EK148 IN MEDIA CONTAINING MEAT PROTEINS

ABSTRACT

In the study, *Lactiplantibacillus plantarum* EK148 strain originating from sucuk was evaluated in terms of gamma amino butyric acid (GABA) production level. The effect of temperature, pH and fermentation time factors on GABA production was evaluated by adding meat protein isolate as a source of glutamic acid to a medium without monosodium glutamate (MSG). With the responses obtained in the experimental design, optimum conditions for *L. plantarum* EK148 strain were determined as 10% protein extract concentration, 33.93 °C temperature, pH 5.05 and 96 hours of fermentation time. It was determined that the lack of fit value between the model and the data obtained using the *L. plantarum* EK148 strain was insignificant, and that protein extract concentration and temperature had a significant effect on GABA production. With this study, meat proteins were used as a source of glutamic acid, and GABA production was carried out using *L. plantarum* EK148 strain in MSG-free medium.

Keywords: GABA, *Lactiplantibacillus plantarum*, RSM, optimization, MSG

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: abereketoglu@bayburt.edu.tr

☎: (+90) 458 211 1153-1646

Aybike Kamiloğlu; ORCID no: 0000-0002-6756-0331

Habibe Memiş; ORCID no: 0000-0002-2696-7493

GİRİŞ

Gama amino bütirik asit (GABA), 4 karbonlu ve non-protein aminoasit yapıda olup canlı organizmalarda serbest halde bulunan önemli bir bileşendir. Fizyolojik pH'larda dipolar formda bulunan GABA, suda çözünür bir amino asittir (Shelp vd., 1999). GABA'nın, bitkilerde varlığı uzun yıllardır bilinmektedir (Sorrequieta vd., 2010). Ayrıca, GABA üretimi birçok maya, küf ve bakteri tarafından da gerçekleştirilmektedir. İnsan metabolizması için yapısal birçok rolü vardır. GABA'nın, sinir iletimini inhibe ederek nöronal uyarılabilirliği azaltma işlevi görüp, anksiyete ve depresyonun engellenmesinde, yüksek kan basıncının kontrolünde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Abdou vd., 2006; Kalueff ve Nutt, 2007; Shimada vd., 2009). Ayrıca diüretik ve antidiyabetik etkilere de sahiptir (Adeghate ve Ponary, 2002). GABA, glutamatın glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi tarafından α -dekarboksilasyonu sonucunda elde edilebilmektedir (Shelp vd., 1999).

GABA göstermiş olduğu fonksiyonel etkilerden dolayı, gıda takviyesi olarak ticari bir öneme sahiptir. Fakat ticari olarak sunulan birçok gıda takviyesi sentetik yollar ile elde edilmektedir. Gıda takviyesi olarak sentetik GABA'nın kullanımının olumsuz etkileri tam olarak açığa kavuşturulmamıştır (Boonstra vd., 2015). Doğal kaynaklara başvurulduğunda ise örneğin; 100 mg düzeyinde GABA sağlayabilmek için yaklaşık olarak 2.34 kg çiğ ıspanak tüketimi sağlanmalıdır (Oh vd., 2003). GABA alımının beslenme ile sağlanmasında bitkilerin yetersiz kalması sonucunda, bu fonksiyonel bileşiğin dışarıdan takviye ediciler ile sağlanması, doğal kabul edilmemektedir (Villegas vd., 2016). Bu nedenle, GABA üretiminde fermentasyon yolunun seçilmesi ve gıdanın doğal yollarla zenginleştirilmesi ilgi görmektedir. Laktik asit bakterilerinin (LAB) yüksek GABA üretim yetenekleri (Dhakal vd., 2012), güvenli (GRAS) olarak kabul görmeleri (Leroy ve De vuyst, 2004) ve fermente gıda, sebze, insan ve hayvan bağırsaklarında sıklıkla bulunmaları (Satokari vd., 2013) nedeni ile ilgi çekicidirler.

Konu ile ilgili çalışmalar değerlendirildiğinde, laktik asit bakterilerinin GABA üretim

aktivitelerini ortamın pH değeri ve ortamdaki glutamik asit varlığının etkilediği görülmektedir. Bu nedenle, GABA üretimini sağlamak amacı ile ortama monosodyum glutamat (MSG) ya da glutamik asit ilavesi yapılmaktadır. Benzer şekilde glutamik asit ilavesi ile laktik asit bakterileri kullanılarak GABA içeriği zenginleştirilmiş gıdalar üzerine birçok araştırma da mevcuttur. Bu gıdalara yoğurt (Park ve Oh, 2007), ekme (Rizello vd., 2008; Coda vd., 2010), peynir (Siragusa vd., 2007; Diana vd., 2014), soya sütü (Ko vd., 2013), fermente sosis (Rataneburee vd., 2013), nohut sütü (Li vd. 2016) vb. örnek verilebilir. Fermente et ürünlerinde, ortamlara kolay adapte olabilmesi ve sahip olduğu probiyotik özellikten dolayı *L. plantarum* türü ön plana çıkmaktadır (de Vries vd. 2006). Yapılan çalışmalarda, MSG kullanımının yaygınlığı ve et ürünleri kaynaklı laktik asit bakterileri üzerine çalışmaların yetersiz olması nedeni ile fermente et ürününden izole edilen *L. plantarum* EK148 suşu ile ortama MSG ilave edilmeden, et proteinlerinden yararlanılarak, GABA üretiminin sağlanması amaçlanmıştır. Bu amaç ile GABA üretimi üzerine farklı et protein ekstrakt düzeyinin yanı sıra farklı pH, fermentasyon süresi ve sıcaklık faktörlerinin etkileri araştırılmıştır. Araştırmada GABA üretiminde farklı koşullar denenmiş ve en yüksek GABA üretimini sağlayan optimum koşul belirlenerek, GABA üretiminin model eldesi sağlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

GABA üretim yeteneğine sahip, sucuk kaynaklı, *L. plantarum* EK148 (MZ636924.1) suşunun GABA üretiminin, pH ve mikrobiyal gelişim ile etkileşimi 144 saat süresince takip edilmiştir. Bu amaçla MSG ilave edilen de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth besiyerinden yararlanılmıştır.

Mikrobiyel gelişim eğrilerinin oluşturulması

100 mM MSG içeren MRS broth besiyerine *L. plantarum* EK148 suşunun 1 gecelik kültüründen %1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Daha sonra 30 °C'de 144 saatlik inkübasyon süresince 6 saat aralıklarla alınan örneklerin mikrobiyal gelişim nedeniyle oluşan ortam bulanıklığının tespiti amacı ile 600 nm'de absorpsiyon değerleri ve MRS agar kullanılarak LAB sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak gelişme eğrisi

oluşturulmuştur. Ayrıca alınan örneklerde GABA düzeyi ve pH değerleri belirlenerek GABA üretiminin gelişim ve pH ile ilişkisi incelenmiştir.

GABA üretim düzeyinin belirlenmesi

GABA üretim düzeyleri, Inertsil ODS 3 kolonu (GL science, 5 µm, 4.6 x 250 mm) yardımıyla HPLC (Shimadzu) cihazı kullanılarak 295-500 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak solvent A (6.25 mL asetik asit, 1.97 g sodyum asetat, 200 mL asetonitril, 1 L ultra saf su) ve solvent B (Asetonitril) kullanılmıştır (1:1, v/v). Türevlendirilmiş örneklerden, 1 µL hacminde enjeksiyon yapılmıştır. 25 °C kolon sıcaklığı ve 1 mL/dk akış hızı kullanılarak ayırım sağlanmıştır. Türevlendirme amacıyla 100 µL örnek, 100 µL DCI (50 mg Dansil klorür, 10 mL aseton) karıştırıldıktan sonra, 800 µL Borat: NaOH (0.2 M Na₂B₄O₇·10 H₂O pH 9.3) eklenmiş ve 40 °C'de 30 dk ultrasonik su banyosunda tutulmuştur. Süre sonunda HPLC vialine 500 µL örnek alınmış ve 500 µL metanol eklenerek vial kapakları kapatılmıştır. Türevlendirilen GABA, floresan dedektörü tarafından tespit edilmiştir. GABA'nın belirlenmesinde standart olarak kullanılan ticari GABA'nın (Sigma-Aldrich) alıkonma süreleri ile örneklerin alıkonma süreleri karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Örneklerde bulunan GABA konsantrasyonlarını belirlemek için, farklı konsantrasyonlarda (0.01-0.1-0.25-0.50-1.0 mg/mL) hazırlanan standartlar test edilerek, örnekteki GABA seviyesi belirlenmiştir (Tuberoso vd., 2015).

Besi ortamının hazırlanması

1:10 (w/v) oranında hazırlanan kıyılmış sığır et örneği/30mM fosfat tamponu karışımı ultraterrax

yardımı ile homojenize edilmiştir. Ardından 20 dk süre ile 10000 g'de santrifüj edilerek, süpernatant filtre edilmiştir. Kalan pellet üzerine 1:19 (w/v) olacak şekilde 0.1 mM fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnek, 10000 g'de 20 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatant filtre edilmiştir (Toldra vd., 1992). Elde edilen süpernatantlar miyofibriller proteinlerden oluştuğundan, sonrasında üzerine eş hacimde 6 M HCl ilave edilerek, 110 °C'de 12 saat bekletilmiştir. İşlem sonrasında nötürleme yapılarak, GABA üretiminde kullanılacak MRS broth besiyerine farklı konsantrasyonlarda (%10, %25, %40) süpernatant ilave edilmiştir. Optimizasyon çalışmasında belirlenen üretim koşullarına uygun olarak, besiyeri pH değeri HCl ve/veya NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Besiyeri toplam hacmine uygun oranda MRS toz besiyeri tartılarak ilave edilmiştir.

Deney tasarımı ve GABA üretiminin optimizasyonu

Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY, Response Surface Methodology) işlemdeki bağımsız değişkenlerin tek veya kombinasyon şeklinde cevap üzerindeki etkilerini incelemektedir. YYY'de öncelikli olarak bağımsız parametreler ve seviyeleri belirlenmektedir. Daha sonra deneysel tasarımın seçimi ve model denkleminin tahmini ve doğrulanması yapılmaktadır. Son olarak, kontur ve yüzey grafiğini elde etmek için optimum noktalar tespit edilmektedir. Çalışmada, GABA üretiminin optimizasyonu için uygulanacak YYY kapsamında incelenen parametreler, Çizelge 1'de verilmiştir. Bu parametrelerin seviyeleri yapılan ön denemeler sonucunda tespit edilmiştir.

Çizelge 1. GABA üretiminde incelenen parametreler ve seviyeleri

Table 1. Parameters and levels studied in GABA production

Değişkenler <i>Independent variables</i>		Değişken seviyeleri <i>Levels</i>		
		-1	0	1
Protein ekstraktı konsantrasyonu (%) <i>Protein extract concentration (%)</i>	X ₁	10	25	40
Sıcaklık (°C) <i>Temperature (°C)</i>	X ₂	30	35	40
pH	X ₃	4	5	6
Fermantasyon süresi (saat) <i>Fermentation time (hour)</i>	X ₄	96	120	144

GABA üreticisi *L. plantarum* suşu ile protein izolatu ilave edilen MRS broth besiyerinde GABA üretiminin optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. MRS broth besiyeri, laktik asit bakterileri için uygun bir et benzeri ortam olarak görülmektedir (Leroy ve De Vuyst, 2001). MRS broth, bileşimi elde edilen protein ekstraktları ile deney tasarımı belirlenen koşullara uygun olacak şekilde hazırlanmıştır. GABA üretimine etki eden önemli parametreler olduğu bilinen protein ekstraktı konsantrasyonu, pH, fermantasyon süresi ve sıcaklık parametreleri YYY kullanılarak optimize edilmiştir. Yanıt Yüzey

Yöntemi kullanılarak bu parametrelerin GABA üretimine etkileri de belirlenmiştir. Bu amaçla MINITAB 19.0 istatistik paket programından yararlanılmıştır.

Çalışmada, 31 deneysel noktadan (24 farklı kombinasyona sahip ve merkezde 7 tekrarlı) oluşan ve dört değişken ile oluşturulan merkezi kompozit istatistiksel dizayn (face centred statistical design, $\sigma=1$) kullanılmıştır. Uygulanan deney tasarımı Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. GABA üretiminin optimizasyon çalışmasında kullanılan deney tasarım dizaynı

Table 2. Experimental design used in the optimization study of GABA production

Deneme Run	X ₁ *	X ₂	X ₃	X ₄
1	10	30	6	144
2	40	40	4	144
3	25	35	4	120
4	25	35	5	120
5	25	35	5	120
6	25	35	5	144
7	10	40	4	96
8	25	35	6	120
9	25	35	5	120
10	40	35	5	120
11	40	30	6	144
12	10	40	4	144
13	25	35	5	120
14	25	35	5	120
15	10	30	6	96
16	10	30	4	96
17	25	35	5	120
18	25	40	5	120
19	10	40	6	96
20	40	30	4	144
21	40	40	6	96
22	25	30	5	120
23	40	30	6	96
24	10	35	5	120
25	40	40	4	96
26	40	40	6	144
27	40	30	4	96
28	25	35	5	120
29	10	30	4	144
30	25	35	5	96
31	10	40	6	144

*X₁, protein ekstraktı konsantrasyonu (%); X₂, sıcaklık (°C); X₃, pH; X₄, fermantasyon süresi (saat).

*X₁, protein extract concentration (%); X₂, temperature (°C); X₃, pH; X₄, fermentation time (hours).

Bağımsız değişkenler olarak protein ekstraktı konsantrasyonu (%), pH, sıcaklık (°C) ve fermantasyon süresi (saat) yanıt olarak ise HPLC ile tespit edilen GABA üretimleri (mg/L) üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Çoklu Regresyon analizlerinde aşağıda yer alan Eşitlik 1'de verilen polinomal quadratik model ve regresyon katsayıları kullanılmıştır. Bu eşitlikte “Y” yanıt olarak GABA üretim miktarını, “X” değerleri bağımsız değişkenleri (Protein ekstraktı konsantrasyonu, sıcaklık, fermantasyon süresi ve pH) ifade ederken, β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} değerleri ise regresyon katsayılarını belirtmektedir.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

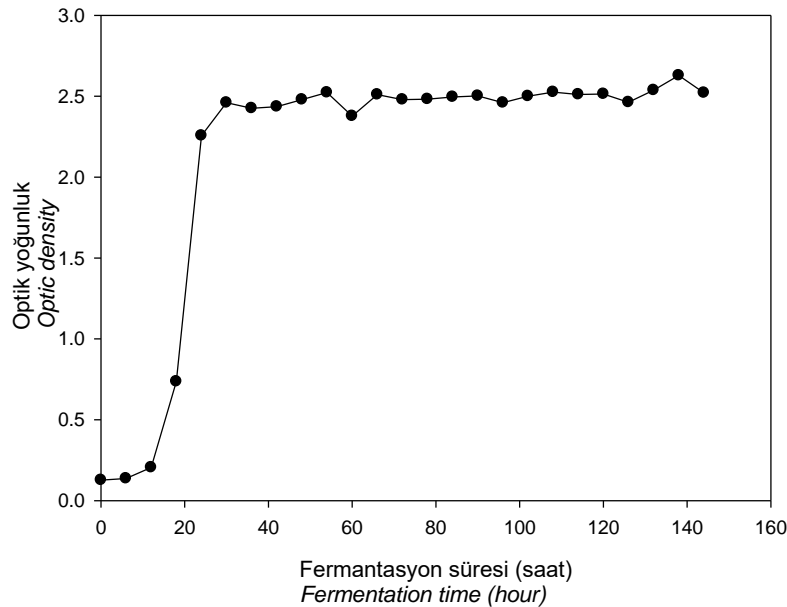
Analiz sonucunda oluşturulan modelin deneysel veriler ile uyumu varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Model uygunluğunu sağlayabilmek için istatistiki olarak uygun olmayan parametreler modelden çıkarılmıştır. Uygun model seçimi uyum eksikliği (lack of fit) ($P > 0.05$) ve R^2 değerlerinden yararlanılarak sağlanmıştır. Optimum parametrelerin belirlenmesinde en yüksek düzeyde GABA üretiminin sağlandığı

koşul göz önüne alınmıştır. Oluşturulan deneme planı ve elde edilen deneysel veriler kullanılarak gerçekleştirilen modelleme sırasında, elde edilen yanıtların değerlendirilmesi ile gidilen optimizasyon işleminde, istenilirlik derecesi (D) hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda doğrulama amacı ile elde edilen optimum parametreler kullanılarak tekrar GABA üretimine gidilmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Mikrobiyal Gelişim Eğrileri

L. plantarum EK148 suşunun GABA üretim düzeyini, gelişim kinetiğini ve pH etkileşimini belirlemek amacıyla MSG bulunan ortamdan yararlanılmıştır. Bu amaçla, 1 L hacminde hazırlanan MSG içeren MRS broth besiyerinde 30 °C'de 144 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında 6 saatte bir alınan örneklerin spektrofotometrede (600 nm) ölçülen absorbans değerleri ile fermantasyon süresine karşı oluşturulan grafik Şekil 1'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere, EK148 suşu 6 saat olan lag fazından sonra log fazına geçmiştir. Bununla birlikte, EK148 suşunun 28 saat sonra durağan faza geçtiği görülmektedir.

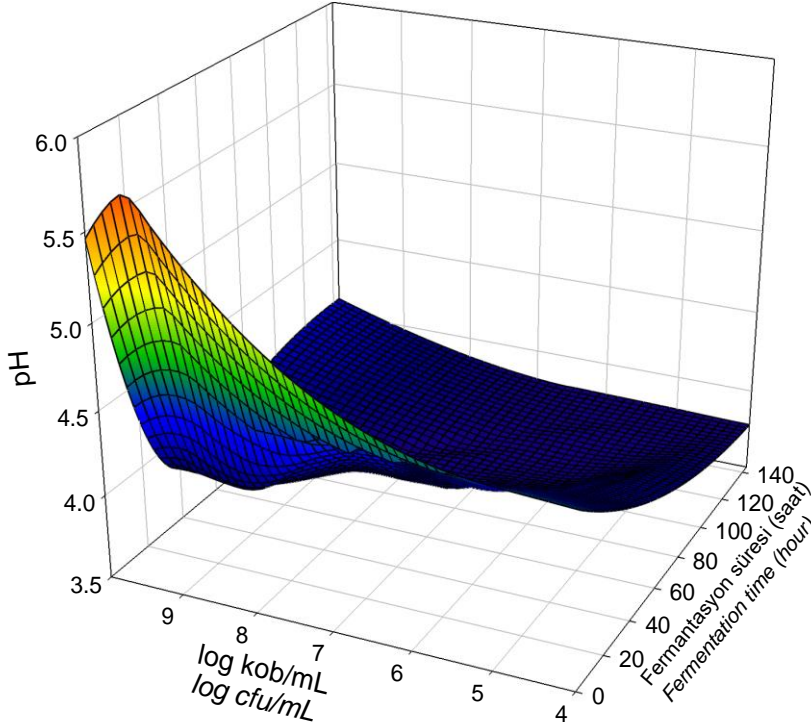


Şekil 1. *L. plantarum* EK148 suşuna ait gelişme eğrisi

Figure 1. Growth curve of *L. plantarum* EK148 strain

144 saat boyunca 6 saat aralıklarla alınan örneklerdeki pH, mikrobiyal sayım değişimini gösteren 3 boyutlu grafik Şekil 2’de verilmiştir. Zamanla mikroorganizma sayısının artışıyla pH’nın düştüğü, düşük pH’nın da

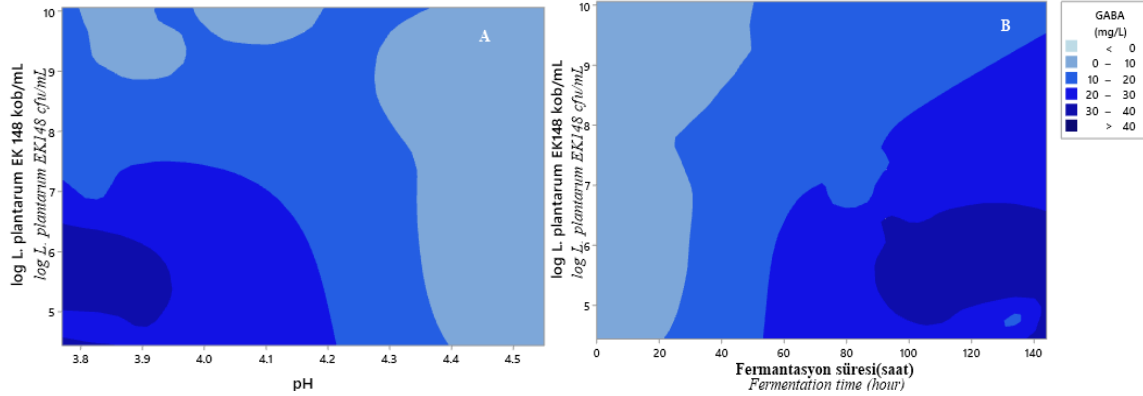
mikroorganizma sayısında azalmaya sebep olduğu görülmektedir. Besiyeri ortamında, biyokütlenin artmasıyla besin kaynaklarının tüketimi, organik asit üretimini de beraberinde getirmiştir. Bu da ortamda pH’nın azalmasını sağlamıştır.



Şekil 2. *L. plantarum* EK148 suşunun gelişim eğrisi (pH*log kob/ml*fermantasyon süresi)
Figure 2. Growth curve of *L. plantarum* EK148 strain (pH*log cfu/ml*fermentation time)

GABA üretim düzeyi üzerine pH ve mikroorganizma sayısının etkisini gösteren grafik Şekil 3A’da verilmiştir. GABA üretiminin 40 mg/L’nin üzerinde olduğu koşullarda *L. plantarum* sayısının yaklaşık olarak 6 log birimdir. Besi ortamında *L. plantarum* sayısının 9 log kob/mL olduğu fermantasyon sürelerine rağmen, GABA üretimi ortamda *L. plantarum* sayısının 3 log birim azalması sonrasında maksimize olduğu görülmektedir. GABA üretiminin *L. plantarum* tarafından üretilen GAD enziminin ortamda bulunan glutamati dekarboksile etmesi ile sağlanmaktadır (Yogeswara vd., 2021). Ortam pH’sının GAD enziminin aktif olduğu pH düzeyine düşmesi ile optimum enzim aktivitesi sonucunda yüksek GABA üretiminin pH’nın 4’ün

altına indiğinde gerçekleştiği görülmektedir. Laktik asit bakterileri, H₂O₂ (Cui vd., 2020) ve organik asit (Park vd., 2021) gibi maddeleri üreterek mikrobiyal gelişimi sınırlayabilmektedir. Gelişimin 60. saatinden sonra ortam pH değerinin 4’ün altında olmasının ve sınırlayıcı faktörlerin de etkisiyle *L. plantarum* sayısında azalma başladığı görülmektedir. Şekil 3B’ de yer alan kontur grafiğinde fermantasyon süresi arttıkça ortamda biriken GABA miktarının arttığı görülmektedir. Bununla birlikte GABA içeriğinin yüksek olduğu durumda ortamdaki canlı mikroorganizma sayısının 5 log birimin altında olduğu görülmektedir. 144 saat fermantasyon sonucunda GABA içeriğinin 40 mg/L nin üzerindedir.



Şekil 3. *L. plantarum* EK148 suşunun GABA üretiminin pH (A) ve fermantasyon süresi (B) ile etkileşimi
Figure 3. The interaction of GABA production of *L. plantarum* EK148 strain with pH and viable cell number

Deney tasarımı ve GABA üretiminin optimizasyonu

Çizelge 1’de yer alan deney tasarımındaki koşullar kullanılarak elde edilen örneklerin GABA analiz sonuçları Çizelge 3’te verilmiştir. Farklı denemeler ile bağımsız değişkenlerin GABA üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. 2. denemede, protein ekstraktı konsantrasyonunun %40, sıcaklığın 40 °C, pH 4, ve fermantasyon süresinin 144 saat olduğu koşulda, GABA üretimi tespit edilmezken, en yüksek GABA üretimi, protein ekstraktı konsantrasyonunun %25, sıcaklığın 35 °C, pH’nın 5 ve fermantasyon süresinin 96 saat olduğu koşulda 53.6768 mg GABA/L ve protein ekstraktı konsantrasyonunun %10, sıcaklığın 35 °C, pH’nın 5 ve fermantasyon süresinin 120 saat konsantrasyonda 48.85 mg/L GABA üretimi tespit edilmiştir. *L. plantarum* EK148 suşu ile MSG içeren ortamda (100mM) yaklaşık 40 mg/L GABA üretimi sağlanırken, protein izolatu ilave edilen ortamda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışma kapsamında hedeflenen MSG içermeyen ortamda GABA üretiminin sağlanmış olduğu görülmektedir. Literatür tarandığında, MSG ilave edilmeden elde edilen fermente ürünlerdeki GABA miktarı MSG ilave edilen ürünlerdeki GABA miktarından daha az olmaktadır (Villegas vd., 2016). Ratanaburee vd. 2013, MSG ilave edilmeden üretilen Tai fermente domuz sosisi örneklerinde 220 mg/ kg GABA tespit ettikleri çalışmalarında, ortama %0.5 oranında MSG ilavesi ile GABA içeriğinin 828 mg/kg’a yükseldiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, Sanchart vd., 2017, fermente karides örneklerinde

%0.5 oranında MSG ilavesinin örneklerin GABA içeriğini 2040 mg/kg’dan 2570 mg/kg düzeyini yükselttiğini bildirmişlerdir. Fakat bu çalışmada glutamik asit kaynağı olarak görülen miyofibriller proteinlerin kullanılmasının sonuç üzerinde etkili olduğu görülmektedir.

Çizelge 4’te yer alan ANOVA ve RSM model istatistikleri değerlendirildiğinde, elde edilen kuadratik modelin iyi tahminleme düzeyine sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen modelin regresyon katsayısı (R^2), ayarlanmış regresyon katsayısı (adj R^2) ve tahmini regresyon katsayısı (pre R^2) değerleri yüksek olduğu gibi, sağladığı p-değeri de oldukça düşüktür. Bu modelin iyileştirilmesi amacı ile modelde yer alan parametrelerin “backward analizi” ile $P > 0.1$ düzeyinde önemsiz olanlarının ayrıştırması sağlanmıştır. Model için regresyon katsayısı değerinin %70’in altında olması modelin yetersiz olduğu hakkında bilgi vermektedir (Granato vd., 2010). Bu çalışmada elde edilen modele ait regresyon katsayısı (0.904), ayarlanmış regresyon katsayısı (0.8625) ve tahminlenmiş regresyon katsayısı (0.7908) değerleri %70 üzerinde tespit edilmiştir. Bu çalışmada denklem yüksek regresyon katsayılarına sahip olup model ile deneysel verilerin model ile uyum sağladığı görülmüştür.

Ayrıca modelin uyum eksikliği (lack of fit) değeri önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). Modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya, model uygunsuzluğu (Lack of

fit) denilmekte ve model uygunluğu için, bu değerin önemsiz olması gerekmektedir (Box ve Draper, 2007). Bunun anlamı, protein ekstraktı konsantrasyonu, sıcaklık, pH değeri ve fermantasyon süresi *L. plantarum* EK148 suşuyla yapılan GABA üretimine etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanıp

tahminlenebileceğidir. Optimizasyon sonrasında elde edilen 2. dereceden denklem izelge 5'te verilmiştir. Laktik asit bakterileri ile GABA üretiminin optimizasyonunda kuadratik modelin tercih edildiği çalışmalar oldukça yaygındır (Tajabadi vd., 2015; Zareian vd., 2013).

Çizelge 3. Cevap yüzey yönteminde kullanılan deneysel tasarımı ve yanıtı
Table 3. Experimental design and response used in the response surface method

Deneme <i>Run</i>	X ₁ *	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₁	Y ₁ *
1	10	30	6	144	19.4412	28.8137
2	40	40	4	144	0.0000	3.6533
3	25	35	4	120	15.5273	19.1610
4	25	35	5	120	31.9584	32.5105
5	25	35	5	120	40.4055	32.5105
6	25	35	5	144	42.6884	45.6899
7	10	40	4	96	6.2856	12.0015
8	25	35	6	120	26.7139	21.2555
9	25	35	5	120	34.1653	32.5105
10	40	35	5	120	23.0112	25.8990
11	40	30	6	144	9.3289	7.5549
12	10	40	4	144	9.4011	8.8408
13	25	35	5	120	29.9593	32.5105
14	25	35	5	120	35.6397	32.5105
15	10	30	6	96	28.5053	31.9744
16	10	30	4	96	36.7521	29.8798
17	25	35	5	120	23.3636	32.5105
18	25	40	5	120	8.6529	6.4172
19	10	40	6	96	13.7104	14.0960
20	40	30	4	144	7.6237	5.4603
21	40	40	6	96	7.6145	8.9086
22	25	30	5	120	15.8488	16.2599
23	40	30	6	96	11.9277	10.7156
24	10	35	5	120	48.8538	39.1221
25	40	40	4	96	8.9901	6.8141
26	40	40	6	144	8.1233	5.7479
27	40	30	4	96	4.3990	8.6211
28	25	35	5	120	31.3204	32.5105
29	10	30	4	144	32.1721	26.7191
30	25	35	5	96	53.6768	48.8506
31	10	40	6	144	14.6367	10.9353

X₁, protein ekstraktı konsantrasyonu (%); X₂, sıcaklık (°C); X₃, pH; X₄, fermantasyon süresi (saat); Y₁, GABA miktarı (mg/L); Y₁ Tahminlenen GABA miktarı (mg/L)

X₁, protein extract concentration (%); X₂, temperature (°C); X₃, pH; X₄, fermentation time (hours); Y₁, amount of GABA (mg/L); Y₁ Estimated amount of GABA (mg/L)

Çizelge 4. GABA üretim miktarına ait RSM model istatistikleri ve ANOVA analizi
 Table 4. RSM model statistics and ANOVA analysis of GABA production levels

Kaynak <i>Source</i>	Serbestlik derecesi <i>Degree of freedom</i>	Kareler toplamı <i>Sum of squares</i>	Kareler ortalaması <i>Mean square</i>	F-Değeri <i>F-value</i>	P-değeri <i>P-value</i>
Model	8	4808.23	601.03	23.74	0.000
Lineer	4	1239.63	309.91	12.24	0.000
X ₁	1	738.98	738.98	29.18	0.000
X ₂	1	435.95	435.95	17.22	0.000
X ₃	1	19.74	19.74	0.78	0.387
X ₄	1	44.96	44.96	1.78	0.197
Kareler <i>Squares</i>	3	3448.68	1149.56	45.40	0.000
X ₂ * X ₂	1	1272.21	1272.21	50.24	0.000
X ₃ * X ₃	1	429.54	429.54	16.96	0.000
X ₄ * X ₄	1	618.29	618.29	24.42	0.000
İnteraksiyon <i>Interactions</i>	1	258.29	258.29	10.20	0.004
X ₁ * X ₂	1	258.29	258.29	10.20	0.004
Hata <i>Error</i>	21	531.76	25.32		
Uyum eksikliği <i>Lack of fit</i>	15	365.08	24.34	0.88	0.614
Saf hata <i>Pure error</i>	6	166.67	27.78		
Toplam <i>Cor total</i>	29	5339.99			
		R ²	Ayarlanmış R ² <i>Adjusted R²</i>	Tahminlenmiş R ² <i>Predicted R²</i>	
Model		%90.04	%86.25	%79.08	

*X₁, protein ekstraktı konsantrasyonu (%); X₂, sıcaklık (°C); X₃, pH; X₄, fermantasyon süresi (saat); Y₁, GABA miktarı (mg/L); Y₁*Tahminlenen GABA miktarı (mg/L)

X₁, protein extract concentration (%); X₂, temperature (°C); X₃, pH; X₄, fermentation time (hours); Y₁, amount of GABA (mg/L); Y₁ Estimated amount of GABA (mg/L)

Çizelge 5. Farklı koşullar altında elde edilen GABA üretiminin regresyon denklemi
 Table 5. Regression equation of GABA production obtained under different conditions

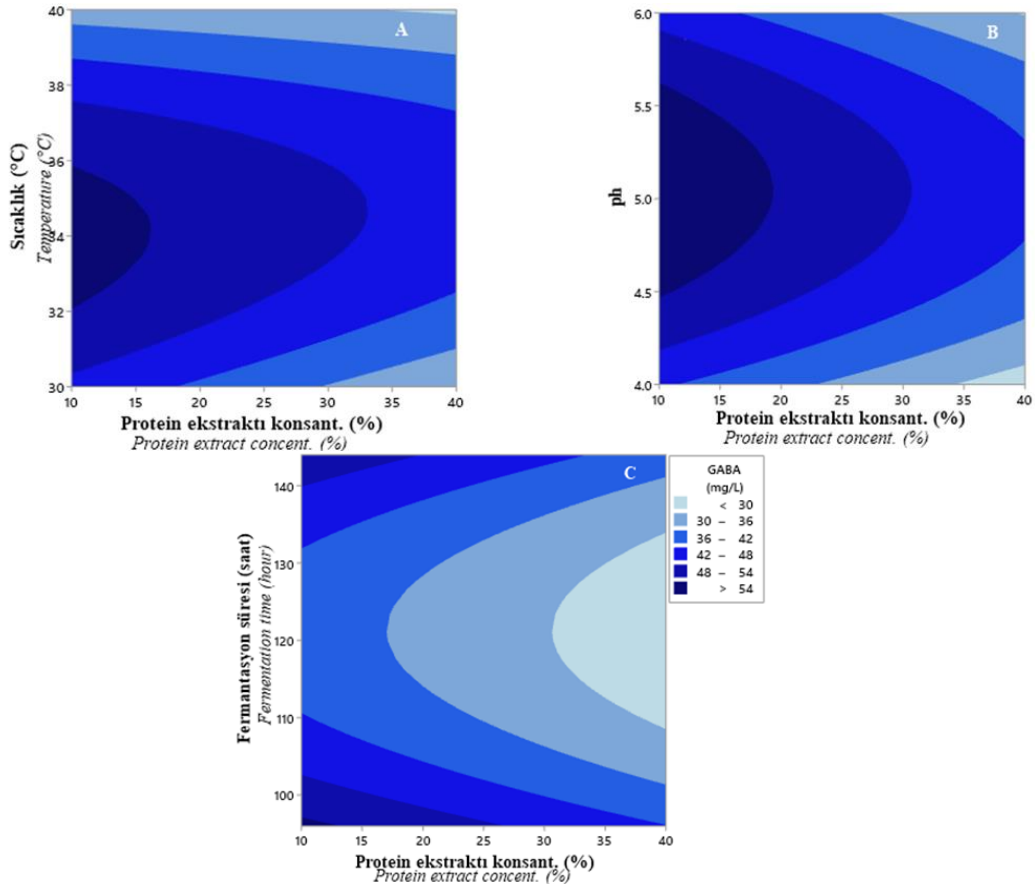
$$GABA (Y_1) = -848.5 - 2.316 X_1 + 56.96 X_2 + 124.1 X_3 - 6.22 X_4 - 0.847 X_2 * X_2 - 12.30 X_3 * X_3 + 0.02562 X_4 * X_4 + 0.0536 X_1 * X_2$$

*X₁, protein ekstraktı konsantrasyonu (%); X₂, sıcaklık (°C); X₃, pH; X₄, fermantasyon süresi (saat); Y₁, GABA miktarı (mg/L); Y₁*Tahminlenen GABA miktarı (mg/L)

X₁, protein extract concentration (%); X₂, temperature (°C); X₃, pH; X₄, fermentation time (hours); Y₁, amount of GABA (mg/L); Y₁ Estimated amount of GABA (mg/L)

Öncesinde, farklı koşullarda inkübe edilen örneklerin GABA içeriklerinin değerlendirildiği istatistikî veriler Çizelge 4'te verilmiştir. GABA üretim düzeyi üzerine en etkili değişkenlerin protein ekstraktı konsantrasyonu ve sıcaklık olduğu görülmektedir ($P < 0.01$). Bunun yanında sıcaklık*sıcaklık, süre*süre, pH*pH ve protein ekstraktı konsantrasyonu*sıcaklık interaksiyonlarının da etkili olduğu görülmektedir ($P < 0.01$). Protein ekstraktı konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve fermantasyon süresi ile GABA üretim düzeyi değişimi Şekil 4A-C'de verilmiştir. Şekil 4A'da görüldüğü üzere, yüksek sıcaklık ve yüksek protein ekstraktı konsantrasyonuna sahip örneklerin GABA içeriklerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedenlerinden biri substrat

olarak artan protein ekstraktı konsantrasyonu GABA üretimi üzerinde sınırlayıcı bir faktör olarak görülebilmektedir. Benzer şekilde, Park vd. (2020) rekombinant *Escherichia coli* suşu ile 500mM, Zhong vd., (2019) ise *Lactobacillus pentosus* SS6 izolatu ile %1 konsantrasyonun üzerinde MSG varlığında, GABA dönüşüm oranının azaldığını bildirmişlerdir. Yapılan ön denemeler ile *L. plantarum* EK148 izolatının 40 °C sıcaklıkta gelişim yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Fakat yüksek sıcaklık varlığında GABA üretiminin azalmış olduğu Şekil 4A'da görülmektedir. Park vd. (2014), *L. plantarum* K154 ile yapmış oldukları çalışmalarında 40 °C' de iyi bir gelişim göstermesinde rağmen, GABA üretim miktarının 37 °C'ye göre azalmış olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4. Farklı deney koşullarında GABA üretim düzeyinin değişimi kontur grafikleri A) protein ekstraktı konsantrasyonu ve sıcaklık, B) protein ekstraktı konsantrasyonu ve pH, C) protein ekstraktı konsantrasyonu ve fermantasyon süresi

Figure 4. Contour plots of the variation of GABA production level under different experimental conditions a) protein extract concentration and temperature, b) protein extract concentration and pH, c) protein extract concentration and fermentation time

Şekil 4B'de ise pH ve protein ekstraktı konsantrasyonunun birlikte GABA üretim düzeyi üzerine etkisi görülmekte olup, GABA üretim düzeyinin, her iki değişkenin en yüksek olduğu durumlarda minimum düzeyde olduğu görülmektedir. pH'nın 5 olduğu koşullarda GABA üretiminin en yüksek olduğu görülmekte iken pH'nın 4.5'in altına inmesi GABA üretimini de azalttığı söylenebilir. Yapılan birçok çalışmada GABA üretiminde başlangıç pH'sının GABA üretimde etkili olduğunu belirtirken, GABA üretiminin genellikle yaklaşık pH 5'te iyi düzeyde olduğunu belirtilmiştir (Komatsuzaki vd., 2008; Tajabadi vd., 2015). Cataldo vd. (2020) başlangıç pH'sını 5.8-7.25 arasında ayarladıkları sistemde *L. brevis* CRL2013'ün etkilenmediğini fakat pH'nın 5.8'in altındaki değerlerde (pH 4) GABA seviyesinde keskin bir düşüş olduğunu tespit etmişlerdir. *L. brevis* AK19B ile elde edilen bu sonuç GABA üretiminin pH'ya bağlılığını ortaya koymaktadır. GABA üretiminde etkili olan GAD enzim aktivitesi üzerinde pH limitleyici olmaktadır (Ohmori vd., 2018; Shin vd., 2014). Bakteriyel aminoasit derboksilazlar ortamdaki H⁺ iyonlarını kullanarak hücre dışında alkalileşmeyi sağlarken hücre içinde proton tüketimiyle, strese karşı koyabilmektedirler (De Biase vd., 1999).

Şekil 4C'de fermantasyon süresi ve protein ekstraktı konsantrasyonunun GABA üretim düzeyi üzerinde etkisi görülmektedir. En yüksek GABA üretimi diğer parametrelerde etkisi ile benzer şekilde protein ekstraktı konsantrasyonunun %20'in altında olduğu koşullarda sağlanırken, fermantasyon süresinin 96 saat olduğu koşullarda tespit edilmiştir. Fakat grafikte dikkat çeken diğer bir nokta ise 96 saatin üzerinde gerçekleştirilen fermantasyonlarda daha düşük GABA üretim düzeyi tespit edilirken, 144 saat fermantasyon süresinde tekrar yüksek GABA üretimi gözlenmektedir. GABA üretiminin laktik asit bakterilerinde 144 saate varabildiği bilinmektedir (Komatsuzaki vd., 2005). Laktobasillerde GABA üretiminde hücre içinde GABA'nın üretilip hücre dışına aktarıldığı yaklaşımı mevcuttur (Higuchi vd., 1997). Çalışmada tespit edilen 144 saatteki bu artışın sebebi olarak parçalanmış hücrelerden dolayı ortama salınan GABA miktarının bu değişimde etkili olduğu söylenebilir.

L. plantarum EK148 suşu ile GABA üretim koşullarının optimizasyonundan elde edilen model kullanılarak, üretim sonrası sağlanan verilerin uyumluluğu Şekil 5'te gösterilmektedir. Deneysel veriler ile tahmini verilere ait grafiğin R² (0.90) değeri 1'e oldukça yakındır. Bunun yanısıra yapılan bu optimizasyon çalışmasında, önerilen GABA üretimini maksimize etmek amacıyla tahmini optimum noktalardan %25 protein ekstraktı konsantrasyonu, 35 °C sıcaklık, pH 5, 96 saat fermantasyon süresi (D=0.91) olan üretim koşullarında GABA üretimi 49 mg/L olarak tahminlenmiştir. Optimum koşullarda yapılan üretim sonucunda 43mg/L GABA üretimi sağlanmıştır. Elde edilen bu sonuç deneysel ve tahmin edilen değerlerin uyum içinde olduğunu göstermektedir.

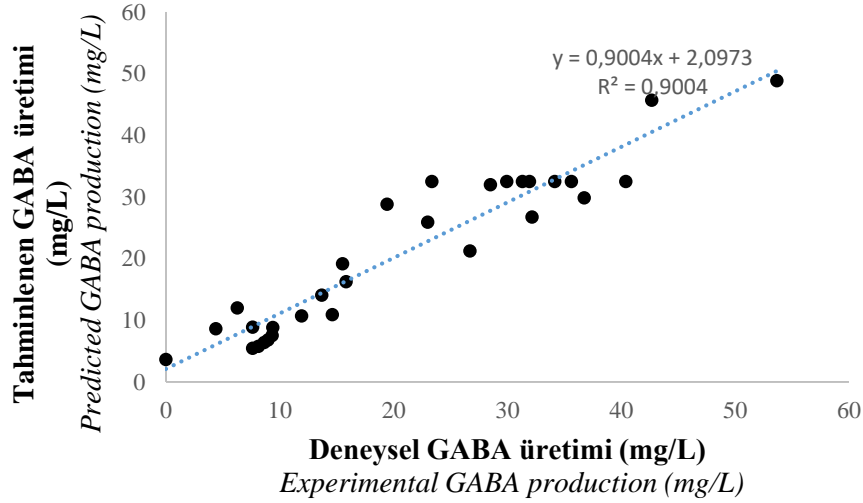
SONUÇ

Sonuç olarak, araştırmada yerel *L. plantarum* suşu kullanılarak, MSG ilave edilmeyen bir ortam sağlanarak GABA üretiminin optimizasyonu planlanmıştır. Bu amaçla, daha önce GABA aktivitesine sahip *L. plantarum* suşu seçilerek en yüksek üretimi sağlayan suş ile optimizasyon çalışmasına gidilmiştir. Ayrıca *L. plantarum* EK148 suşunun 144 saat süresince 100 mM MSG bulunan MRS ortamında 6 saatlik aralıklarla pH, optik yoğunluk, canlı hücre sayısı ve GABA üretim düzeyi takip edilmiştir.

Deneysel tasarım oluşturmak için ön denemeler ile belirlenen faktör seviyeleri kullanılmıştır. *L. plantarum* EK148 suşunun protein izolatı (%10, %25, %45) içeren MRS ortamında, sıcaklık (30, 35 ve 40 °C), başlangıç pH değeri (4.0, 5.0 ve 6.0), fermantasyon süresi (96, 120 ve 144 saat) ve faktörleri esas alınarak oluşturulan deney tasarımı (Yanıt Yüzey Yöntemi) kullanılarak, optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmasında elde edilen modelin, deneysel veriler ile uyumluluğu doğrulanmıştır. Elde edilen optimum koşullarda 49mg/L olarak tahminlenmiştir. Optimum koşullarda deneysel olarak 43mg/L GABA üretimi sağlanmıştır. Yapılan bu çalışma ile et miyofibriller proteinlerinin glutamik asit kaynağı olarak kullanımı sağlanmış ve MSG içermeyen ortamda *L. plantarum* EK148 suşu kullanılarak GABA

üretimi sağlanmıştır. Gelecekte, *L. plantarum* EK148 suşunun GABA üretim düzeylerinin optimize edildikleri koşullar dikkate alınarak biyoreaktörde üretim yapıp, fermentasyon

sıcaklığı, havalandırma hızı gibi faktörlerin de etkilerinin incelenerek daha fazla GABA üretimi hedeflenmektedir.



Şekil 5. *L. plantarum* EK148 suşunun GABA üretimin optimizasyon çalışması ile elde edilen modelin deneysel veriler ile uyumluluğu

Figure 5. Compatibility of the model obtained by optimization study of GABA production of *L. plantarum* EK148 strain with experimental data

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı TOVAG 1200877 proje numarası ile maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., Yokogoshi, H. (2006). Relaxation and immunity enhancement effects of γ -aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors*, 26(3): 201-208.

Adeghate, E., Ponery, A.S. (2002). GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell*, 34:1-6.

Boonstra, E., de Kleijn, R., Colzato, L. S., Alkemade, A., Forstmann, B. U., Nieuwenhuis, S. (2015). Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. *Frontiers in psychology*, 6; 15-20.

Box, G. E., Draper, N. R. (2007). *Response surfaces, mixtures, and ridge analyses*. John Wiley & Sons, New Jersey, 856.

Cataldo, P. G., Villegas, J. M., Savoy de Giori, G., Saavedra, L., Hebert, E. M. (2020). Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CRL 2013 based on carbohydrate fermentation. *International journal of food microbiology*, 333: 108792. doi: [https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.\(2020\).108792](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.(2020).108792)

Coda, R., Rizzello, C. G., Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *International journal of food microbiology*, 137(2):236-245.

Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., Qu, X. (2020). Production of Gamma-Aminobutyric Acid from Lactic Acid Bacteria: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3): 995.

- Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/995>
- De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F., Visca, P. (1999). The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Molecular microbiology*, 32(6): 1198-1211.
- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9): 1018-1028.
- Dhakal, R., Bajpai, V. K., Baek, K. H. (2012). Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4): 1230-1241.
- Diana, M., Tres, A., Quílez, J., Llombart, M., Rafecas, M. (2014). Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2): 351-355.
- Granato, D., Ribeiro, J. C. B., Castro, I. A., Masson, M. L. (2010). Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chemistry*, 121(3):899-906.
- Higuchi, T., Hayashi, H., Abe, K. (1997). Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *Journal of bacteriology*, 179(10): 3362-3364.
- Kalueff, A. V., Nutt, D. J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and anxiety*, 24(7): 495-517.
- Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T., Shima, J. (2008). Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(2): 278-285.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., Kimura, T. (2005). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food microbiology*, 22(6): 497-504. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.002>
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2001). Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4407-4413.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2): 67-78.
- Li, W., Wei, M., Wu, J., Rui, X., Dong, M. (2016). Novel fermented chickpea milk with enhanced level of γ -aminobutyric acid and neuroprotective effect on PC12 cells. *PeerJ*, 4: e2292.
- Oh, S. H., Moon, Y. J., Oh, C. H. (2003). γ -Aminobutyric acid (GABA) content of selected uncooked foods. *Journal of Food Science and Nutrition*, 8(1): 75-78.
- Ohmori, T., Tahara, M., Ohshima, T. (2018). Mechanism of gamma-aminobutyric acid (GABA) production by a lactic acid bacterium in yogurt-sake. *Process Biochemistry*, 74: 21-27. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.030>
- Park, J. Y., Park, Y.-L., Choi, T.-R., Kim, H. J., Song, H.-S., Han, Y.-H., . . . Bhatia, S. K. (2020). Production of γ -aminobutyric acid from monosodium glutamate using *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis with glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* KCTC 3498. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 37(12): 2225-2231.
- Park, K. B., Oh, S. H. (2007). Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresource Technology*, 98(8): 1675-1679.
- Park, S. J., Kim, D. H., Kang, H. J., Shin, M., Yang, S.-Y., Yang, J., Jung, Y. H. (2021). Enhanced production of γ -aminobutyric acid (GABA) using *Lactobacillus plantarum* EJ(2014) with simple medium composition. *LWT*, 137: 110443. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110443>

- Park, S.-Y., Lee, J.-W., Lim, S.-D. (2014). The probiotic characteristics and GABA production of *Lactobacillus plantarum* K154 isolated from kimchi. *Food science and biotechnology*, 23(6): 1951-1957.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., Sukhoom, A. (2013). Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) in Nham (Thai fermented pork sausage) using starter cultures of *Lactobacillus namurensis* NH2 and *Pediococcus pentosaceus* HN8. *International Journal of food microbiology*, 167(2): 170-176.
- Sanchart, C., Rattanaporn, O., Haltrich, D., Phukpattaranont, P., Maneerat, S. (2017). Enhancement of gamma-aminobutyric acid (GABA) levels using an autochthonous *Lactobacillus futsaii* CS3 as starter culture in Thai fermented shrimp (Kung-Som). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(8): 152. doi: 10.1007/s11274-017-2317-3
- Satokari R.M., Vaughan E.E., Smidt H., Saarela M., Matto J., de Vos W.M. (2013). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol*, 26:572–584.
- Shelp, B. J., Bown, A. W., McLean, M. D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in plant science*, 4(11): 446-452.
- Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T., Matsubayashi, T. (2009). Anti-hypertensive effect of γ -aminobutyric acid (GABA)-rich *Chlorella* on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clinical and Experimental Hypertension*, 31(4): 342-354.
- Shin, S.-M., Kim, H., Joo, Y., Lee, S.-J., Lee, Y.-J., Lee, S. J., Lee, D.-W. (2014). Characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and its C-terminal function for the pH dependence of activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(50): 12186-12193.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and environmental microbiology*, 73(22): 7283-7290.
- Sorrequieta, A., Ferraro, G., Boggio, S. B., Valle, E. M. (2010). Free amino acid production during tomato fruit ripening: a focus on L-glutamate. *Amino acids*, 38(5): 1523-1532.
- Tajabadi, N., Ebrahimpour, A., Baradaran, A., Rahim, R. A., Mahyudin, N. A., Manap, M. Y. A., vd. (2015). Optimization of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 from honeybees. *Molecules*, 20(4): 6654-6669.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., Part, C., Cerveró, C., Rico, E., Motilva, M. J., Flores, J. 1992. Muscle and adipose tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 57(4): 816-818.
- Tuberoso, C. I. G., Congiu, F., Serreli, G., Marni, S. (2015). Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food chemistry*, 175: 29-35.
- Villegas, J. M., Brown, L., Savoy de Giori, G., Hebert, E. M. (2016). Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 67: 22-26. doi: [https://doi.org/10.1016/j.lwt.\(2015\).11.027](https://doi.org/10.1016/j.lwt.(2015).11.027)
- Yogeswara, I. B. A., Kittibunchakul, S., Rahayu, E. S., Domig, K. J., Haltrich, D., Nguyen, T. H. (2021). Microbial Production and Enzymatic Biosynthesis of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Using *Lactobacillus plantarum* FNCC 260 Isolated from Indonesian Fermented Foods. *Processes*, 9(1): 22. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/1/22>
- Zareian, M., Ebrahimpour, A., Mohamed, A. K. S., Saari, N. (2013). Modeling of glutamic acid production by *Lactobacillus plantarum* MNZ. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(4): 12-12.