



***Levilactobacillus brevis* AK19B SUŞU İLE γ -
AMİNOBÜTİRİK ASİT ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

Habibe MEMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

Gıda Mühendisliği

Ana Bilim Dalı

Dr. Öğr. Üyesi Aybike KAMILOĞLU

2021

(Her Hakkı Saklıdır)

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

***Levilactobacillus brevis* AK19B SUŞU İLE γ -AMİNOBÜTİRİK ASİT ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU**

(Optimization of γ -Aminobutyric Acid Production with *Levilactobacillus brevis* AK19B Strain)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Habibe MEMİŞ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aybike KAMILOĞLU

Bayburt
Kasım, 2021

ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Levilactobacillus brevis* AK19B Suşu ile γ -Aminobütirik Asit Üretiminin Optimizasyonu” başlıklı çalışmanın tarafımdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını ve yararlandığım eserleri kaynakçada gösterdiğimi beyan ederim.

16/11/2021

Habibe MEMİŞ

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitim hayatım da yardımını esirgemeyen, yüksek lisans tez konumun seçiminde, planlanmasında, çalışmalarımın her aşamasında değerli katkıları, önerileri ve desteklerinden dolayı danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aybike KAMILOĞLU' na teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Hayatımın bütün alanlarında bana her konuda destek olan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.



ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Levilactobacillus brevis AK19B İLE γ -AMİNOBÜTİRİK ASİT ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Habibe MEMİŞ

Kasım 2021, 52 sayfa

Bu çalışmada ekşi mayalı hamurdan izole edilen ve fenotipik olarak tanımlanan *Levilactobacillus brevis* AK19B suşunun genetik tanımlaması yapılmış ve tekno-fonksiyonel özellikleri incelenerek γ -aminobütirik asit (GABA) üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Suş spot kültür yöntemi ile *Escherichia coli* BC 1402, *Salmonella typhimurium* RSSK 95091 ve *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729' a karşı iyi bir antimikrobiyal aktivite ve küflere karşı antifungal aktivite göstermiştir. İzolat 25 °C' de çok iyi bir gelişim ve 45 °C' de zayıf gelişim gösterirken 4 °C' de gelişmemiştir. pH 5 ve pH 8' de çok iyi gelişme gösteren izolat, %7 NaCl içeren ortamda %10 ve %15 NaCl içeren ortama göre daha iyi gelişim sergilemiştir. *L. brevis* AK19B suşu termotolerant olmayan, hidrofilik karakterde ve fitaz enzim aktivitesine sahip bir LAB suşu olarak karakterize edilmiştir. Bunun yanı sıra safra tuzu içeren ortamlarda canlılığını belirli bir süre koruyabildiği ve antioksidan aktivite sergilediği tespit edilmiştir. *L. brevis* AK19B' nin streptomisin, ampisilin, eritromisin, tetrasisin, penisilin, kanamisin ve kloramfenikole karşı direnç göstermediği belirlenmiştir. Çalışmada GABA üretiminde kullanılan monosodyum glutamat konsantrasyonu (MSG), NaCl konsantrasyonu, sıcaklık ve pH bağımsız değişkenlerinin Box-Behnken deneme desenine göre optimizasyonu Design-Expert paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tasarımın önerdiği deneyler sonucunda bağımsız değişkenlerin yanıtlar üzerine olan etkilerini ifade eden modeller oluşturulmuş ve modellerin uygunluğu varyasyon analizleri (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda optimum koşullar pH için 4-8, inkübasyon sıcaklığı 25-40 °C, MSG konsantrasyonu 100-300 mM ve NaCl konsantrasyonu için 0-4 mM aralığında değişmektedir. Yapılan denemeler neticesinde bağımsız değişkenlerin GABA üretimi üzerine farklı etkileri olduğu belirlenmiştir. ANOVA ve RSM model istatistiklerinden hareketle quadratik modelin GABA üretimi için daha uygun olduğu ve modelin ($p < 0,001$) önemli olduğunu göstermiştir. Maksimum düzeyde GABA eldesi için pH 5,136, MSG konsantrasyonunun 297, sıcaklığın 26 ve NaCl konsantrasyonunun 2,82 olduğu optimum üretim koşullarının uygulandığı bu çalışmada GABA üretiminin 43,85 mg/mL olarak tahminlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *L. brevis*, fonksiyonel, GABA, optimizasyon, Box-Behnken.

ABSTRACT

MASTER THESIS

OPTIMIZATION OF γ -AMINOBUTYRIC ACID PRODUCTION WITH *Levilactobacillus brevis* AK19B

Habibe MEMİŞ

November 2021, 52 pages

In this study, genetic identification of *Levilactobacillus brevis* AK19B strain isolated from sourdough dough and identified phenotypically was made and γ -aminobutyric acid (GABA) production was optimized by examining its techno-functional properties. The strain showed good antimicrobial activity against *Escherichia coli* BC 1402, *Salmonella typhimurium* RSSK 95091 and *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 and antifungal activity against molds by spot culture method. The isolate grew very well at 25 °C and poorly at 45 °C, but failed at 4 °C. The isolate, which showed very good growth at pH 5 and pH 8, showed better growth in the medium containing 7% NaCl than in the medium containing 10% and 15% NaCl. *L. brevis* AK19B strain was characterized as a non-thermotolerant, hydrophilic LAB strain with phytase enzyme activity. In addition, it has been determined that it can maintain its vitality for a certain period of time and exhibit antioxidant activity in environments containing bile salt. It was determined that *L. brevis* AK19B did not show resistance to streptomycin, ampicillin, erythromycin, tetracyclin, penicillin, kanamycin and chloramphenicol. In the study, the optimization of the monosodium glutamate concentration (MSG), NaCl concentration, temperature and pH independent variables used in GABA production according to the Box-Behnken experimental design was carried out using the Design-Expert package program. As a result of the experiments suggested by the design, models expressing the effects of independent variables on the responses were created and the suitability of the models was evaluated by analysis of variation (ANOVA). As a result of the data obtained, optimum conditions range from 4-8 for pH, incubation temperature 25-40 °C, MSG concentration 100-300 mM and for NaCl concentration 0-4 mM. As a result of the experiments, it was determined that the independent variables had different effects on GABA production. Based on the ANOVA and RSM model statistics, it has been shown that the quadratic model is more suitable for GABA production and the model ($p < 0.001$) is important. For maximum GABA production, optimum production conditions of pH 5.136, MSG concentration of 297, temperature of 26 and NaCl concentration of 2.82 were applied, and GABA production was estimated as 43.85 mg/mL.

Keywords: *L. brevis*, functional, GABA, optimization, Box-Behnken.

İÇİNDEKİLER

ETİK BİLDİRİMİ	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZ	iii
ABSTRACT	iv
TABLOLAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	ix
BİRİNCİ BÖLÜM	1
Giriş.....	1
Araştırmanın Konusu ve Problemi	1
Araştırmanın Amacı	3
Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi	3
İKİNCİ BÖLÜM.....	5
Kuramsal Çerçeve ve Alan Yazın Derleme	5
Kuramsal Çerçeve	5
Alan Yazın Derlemesi	8
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM.....	12
Materyal ve Yöntem	12
Materyal	12
Yöntem.....	12
GABA üretim yeteneğine sahip izolatların tespit edilmesi.	12
Laktik asit bakterilerinin tanımlanması.	12
Moleküler tanılama.....	12
16s rRNA analizi.	13
PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.	14
PZR ürünlerinin sekans analizi ve değerlendirmesi.	15
GABA üretim miktarlarının HPLC ile tespit edilmesi.	15
Laktik asit bakterilerinin tekno-fonksiyonel özelliklerinin tespit edilmesi.	15
Farklı pH değerinde gelişmenin belirlenmesi.	15
Farklı sıcaklıklarda gelişmenin belirlenmesi.	16
Yüksek tuz konsantrasyonunda gelişmenin belirlenmesi.	16
Termotolerant kapasitesinin belirlenmesi.....	16
Safra tuzuna direncin belirlenmesi.	16
Mide ortamına direncin belirlenmesi.....	17

Hücre yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi.	17
Antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesi.	18
Antifungal aktivitenin belirlenmesi.	18
Antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi.	19
Antioksidan aktivitenin belirlenmesi.	19
Fitaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi.	19
GABA üretiminin optimizasyonu.	21
Deney tasarımı.	21
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	25
Araştırma Bulguları ve Tartışma	25
GABA Üretim Yeteneğine Sahip İzolatların Tespiti	25
Moleküler Tanılama	25
16s rRNA analizi ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.	25
Laktik Asit Bakterisinin Tanımlanması	26
Farklı pH Değerinde Gelişme	26
Farklı Sıcaklıklarda Gelişim.....	26
Termotolerant Kapasite	27
Yüksek Tuz Konsantrasyonunda Gelişme	27
Safra Tuzuna Direnç.....	28
Mide Ortamına Direnç	28
Hücre Yüzey Hidrofobisitesi.....	29
Antimikrobiyal Etki Spektrumu	30
Antifungal Aktivite	30
Antibiyotik Dirençliliği	31
Antioksidan Aktivite	32
Fitaz Enzimi Aktivitesi.....	33
Deney Tasarımı	34
Modelin Doğrulanması.....	39
Optimum Noktanın Belirlenmesi ve Geçerliliği	39
BEŞİNCİ BÖLÜM	40
Sonuçlar	40
Kaynakça	43
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>GABA' nın Sağlık Üzerine Etkileri</i>	6
Tablo 2. <i>GABA Üreten Laktik Asit Bakterileri ve İzole Edildiği Kaynaklar</i>	6
Tablo 3. <i>PZR Programı</i>	14
Tablo 4. <i>Çalışmada Kullanılan İndikatör Mikroorganizmalar</i>	18
Tablo 5. <i>Bağımsız Değişkenlerin Alt ve Üst Sınır Değerleri</i>	22
Tablo 6. <i>Box-Behnken Deney Tasarımı</i>	23
Tablo 7. <i>L. brevis AK19B' nin Farklı pH Değerinde Gelişimi</i>	26
Tablo 8. <i>L. brevis AK19B' nin Farklı Sıcaklıklarda Gelişimi</i>	27
Tablo 9. <i>L. brevis AK19B' nin Yüksek Tuz Konsantrasyonunda Gelişimi</i>	27
Tablo 10. <i>L. brevis AK19B' nin Antimikrobiyal Etki Düzeyleri</i>	30
Tablo 11. <i>L. brevis AK19B' nin Antifungal Etki Düzeyleri</i>	31
Tablo 12. <i>L. brevis AK19B Suşuna Ait Antibiyotik Direnç Testi Verileri</i>	32
Tablo 13. <i>Antioksidan aktivite</i>	33
Tablo 14. <i>GABA Üretim Miktarına Ait RSM Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi</i>	34
Tablo 15. <i>GABA Üretim Miktarına Ait RSM Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi (Tablo 14. devamı)</i>	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. GAD ile katalizlenen L-glutamatın GABA dekarboksilasyonu.	5
Şekil 2. GABA oluşum mekanizması (Akt., Yalçınkaya vd., 2019, s. 2).	7
Şekil 3. Hyperladder I (Bioline, İngiltere) fragment boyutları ve miktarları.	14
Şekil 4. İnorganik fosfat standart eğrisi.	21
Şekil 5. <i>L. brevis</i> AK19B GABA üretimini gösteren TCL görüntüsü.	25
Şekil 6. PZR ürününün jel elektroforez görüntüsü (*: Leader, **: AK19B).	25
Şekil 7. Safra tuzları varlığında <i>L. brevis</i> AK19B' nin ortamdaki varlığı.	28
Şekil 8. <i>L. brevis</i> AK19B' nin mide ortamına dayanıklılığı (A: İnkübasyon öncesi 10^{-7} seyreltme, B: Yıkama sonrası (inkübasyon öncesi) 10^{-1} seyreltme)	29
Şekil 9. <i>L. brevis</i> AK19B' nin antifungal aktivitesi.	31
Şekil 10. Sıcaklık, pH, NaCl ve MSG konsantrasyonunun GABA üretimi üzerine etkisi A: MSG* pH verilerine ait üç boyutlu interaksiyon grafiği (sıcaklık=32,5°C NaCl=2mM) B: sıcaklık*MSG verilerine ait üç boyutlu interaksiyon grafiği (pH=6, NaCl=2mM) C: pH*sıcaklık verilerine ait üç boyutlu interaksiyon grafiği (MSG=300mM, NaCl=2mM).	38
Şekil 11. <i>L. brevis</i> AK19B suşunun GABA üretimin optimizasyon çalışması ile elde edilen modelin deneysel veriler ile uyumluluğu.	39

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Γ (γ)	: Gama
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μm	: Mikromol
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
ppm	: Part per million
g	: Gram
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
w/v	: Weight/Volume (Ağırlık/Hacim)
v/v	: Volume/Volume (Hacim/Hacim)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
rpm	: Revolution per minute (Dakikada devir)
dk	: Dakika
kob	: Koloni oluşturan bakteri
RSM	: Response Surface Method (Yanıt Yüzey Yöntemi)
UV	: Ultraviyole (Morötesi)
NaCl	: Sodyum klorür
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
HCl	: Hidroklorik asit
NaOH	: Sodyum hidroksit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DCI	: Dansyl chloride (Dansil klorür)

BİRİNCİ BÖLÜM

Giriş

Araştırmanın Konusu ve Problemi

Son yıllarda tüketici alışkanlıklarının değişmesiyle birlikte sağlıklı olan gıdalara yönelim, artan sağlık maliyetleri, yaşam süresinin uzaması, nüfusun artması gibi çeşitli sebeplerden ötürü artış göstermektedir. Bu doğrultuda fonksiyonel gıdalar ve fonksiyonel gıda bileşenleri önemli bir role sahiptir ve yeni bir tür sağlık aracı sunmaktadır (Gul, Singh, & Jabeen, 2016; Hassani, Procopio, & Becker, 2016; Ozen, Pons, & Tur, 2012). Fonksiyonel gıda terimi, doğal olarak oluşabilen, normal diyetin bir parçası olarak tüketilen, artan konsantrasyonlarda gıdalarda bulunan, hedeflenen fonksiyonlar üzerinde olumlu etkileri teşvik ettiği bilimsel olarak gösterilen geleneksel gıdalardır. Bu gıdaların tüketimi hastalık riskini azalttığı gibi yaşam kalitesini yükselterek sağlık durumunun iyileştirilmesini sağlayabilmektedir. Bu gıdalar, fizyolojik fonksiyonları geliştirmek, hastalıkları iyileştirmek ve önlemek için kullanılabilmektedir (Lopez-Varela, González-Gross, & Marcos, 2002, s. 30).

Fonksiyonel gıdaların besinsel işlevselliği, içeriğindeki biyoaktif bileşenlerle bağdaştırılmaktadır. Bu bileşenlerden biri olan γ -aminobütirik asit (GABA) birçok biyoaktiviteye sahip olup fonksiyonel gıdalarda büyük bir uygulama potansiyeline sahiptir (H. Li, & Cao, 2010). GABA'nın beyinde önemli bir nörotansmitter inhibitörü görevi görüp anksiyete ve depresyonun engellenmesi, beyine enerji sağlanması, oksijen eksikliği ve diğer stres durumlarına direnç kazandırılması ve yüksek kan basıncının kontrolünde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Kalueff, & Nutt, 2007; Möhler, 2012; Shimada vd., 2009). GABA, kolon kanser hücresi, meme bezi ve hepatik kanser hücreleri gibi kanser hücrelerinin saldırılarını ve metastazını önleyebilen veya geciktirebilen etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Diana, Tres, Quílez, Llombart, & Rafecas, 2014). Ayrıca bağışıklık sistemi ile ilgili hücrelerin uyarılmasında GABA'nın etkili olduğu bilinmektedir (Siragusa vd., 2007). GABA üzerine yapılan çalışmalar uyku düzeni ve rahatlama üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Yalçinkaya, Kılıç, & Çakmakçı, 2019).

GABA doğada yaygın olarak bulunan, dört karbonlu, protein yapıda olmayan bir aminoasit olup (Yunes vd., 2016, s. 1), beyinde doğal yolla üretildiği gibi (Yalçinkaya, Kılıç, & Çakmakçı, 2019), bitkilerde büyüyüp gelişme ve tohumun çimlenmesi sırasında önemli ölçüde artmaktadır (Sita, & Kumar, 2020).

Mikroorganizmalar tarafından GABA üretimi gerçekleştirilebilirken, güvenli (GRAS) statüsünde olmaları sebebiyle bu grup içerisindeki laktik asit bakterileri (LAB), gıdalarda kullanımı açısından öne çıkan GABA üreticilerindendir (Dhakal, Bajpai, & Baek, 2012). GABA' nın biyosentezi, GAD enzimi (gadA veya gadB tarafından kodlanır) ve glutamat / GABA antiporter gadC' den oluşan glutamik asit dekarboksilaz (GAD) sistemi tarafından gerçekleştirilir (Cui, Miao, Niyaphorn, & Qu, 2020, s. 2).

Laktik asit bakterileri, gram pozitif bakterilerin önemli bir grubu olup fermente gıdalarda, sebze, insan ve hayvan bağırsaklarında sıklıkla bulunurlar (Satokari vd., 2003). GABA üreten laktik asit bakterileri, bazı gıdalardan izole edilerek veya kültür koleksiyonlarından elde edilebilmektedir (Yalçinkaya vd., 2019). Literatürdeki çalışmalara dikkat edildiğinde GABA üretim yeteneğine sahip LAB' ın büyük çoğunluğunun geleneksel fermente ürünlerden izole edildiği görülür. İzole edilen kaynaklar arasında peynir (Siragusa vd., 2007), yoğurt (K.-B. Park, & Oh, 2007), kimchi (J. Y. Kim, Lee, Ji, Lee, & Hwang, 2009), paocai (H. Li, Qiu, Gao, & Cao, 2010), ekmek (Coda, Rizzello, & Gobbetti, 2010), geleneksel fermente balık (Komatsuzaki, Shima, Kawamoto, Momose, & Kimura, 2005) ve fermente sosis (Ratanaburee, Kantachote, Charernjiratrakul, & Sukhoom, 2013) gibi ürünler yer almaktadır.

Laktik asit bakterileri patojenik bakterilerin inhibisyonu, mide asidine direnç, safra asidi direnci, bağırsak homeostazının kontrolü ve antialerjik aktivite gibi özelliklerinden dolayı probiyotik göreve sahiptir (Hwanhlem vd., 2010). LAB, biyokontrol ajanları, gıda başlatıcıları ve kıvam artırıcı olarak çeşitli üretim aşamalarında kullanılır (Laroute, Mazzoli, Loubière, Pessione, & Coccagn-Bousquet, 2021). LAB fermantasyon uygulamalarında oldukça önemlidir ve güvenli bir uygulama ve tüketim geçmişine sahiptir (Leroy, & De Vuyst, 2004; H. Li, Qiu, Chen, & Cao, 2011).

LAB' ın yüksek GABA üretimi hücrelerde bulunan GAD enziminin aktivitesi ile ilgilidir ve GABA üretimi için gıda matrisindeki glutamik asit konsantrasyonunun yüksek olması gerekmektedir (Diana vd., 2014). *Lactococcus lactis*, GAD enzimi üretiminden sorumlu sadece gadB genini taşıırken, *L. brevis*' de de *L. lactis*' e benzer şekilde gadB genine yakın bir yerde tespit edilen gadC' ye benzer genin varlığı asit toleransının GAD aktivitesiyle bağlantılı olduğunu göstermektedir. Dekarboksilasyon sırasında GAD enziminin GABA' ya dönüşümü ile asitlenmenin kontrol altında tutulduğu varsayılmaktadır. Söz konusu pH düşüşü ile GAD aktivitesi indüklenmektedir (H. Li, & Cao, 2010). GAD enzimi *Lactobacillus brevis* (J. Y. Kim vd., 2009; Ueno, Hayakawa, Takahashi, & Oda, 1997), *Lactobacillus* sp. (Higuchi, Hayashi, & Abe, 1997), *Lactococcus lactis* (Lu, Xie, & Gu, 2009; Masaru Nomura vd., 1999), *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* (Komatsuzaki vd., 2005), *Lactobacillus delbrueckii* sbsp.

bulgaricus ve *Lactobacillus plantarum* (Siragusa vd., 2007) gibi çeşitli gıdalardan izole edilen birçok laktik asit bakterisinden karakterize edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinden GABA üretimi için başlıca etkenler kültür ortamı sıcaklığı, glutamat konsantrasyonu, karbon kaynakları, piridoksal 5-fosfat (PLP) ve pH olarak sıralanmaktadır (Cho, Chang, & Chang, 2007; Komatsuzaki vd., 2005; H. Li vd., 2010; Lu, Chen, Gu, & Han, 2008; Lu vd., 2009). Bu etkenlerin optimize edilmesiyle de GABA üretimi artırılabilir (H. Li, & Cao, 2010). pH, LAB tarafından GABA biyosentezi için anahtar faktör olup bakteri üremesini ve GAD aktivitesini etkiler (Cui vd., 2020). GAD aktivitesi, bir suşun GABA verimini belirlemek için önemli bir faktör olup pH ve sıcaklığın yanında L-glutamik asit ve piridoksal 5-fosfattan da etkilenmektedir.

Laktik asit bakterileri GABA üretimi için yeterli L-glutamik asit sentezleyememektedir (Cui vd., 2020). Glutamat kaynağı olarak literatür incelendiğinde ise ekşi mayalı ürünlerde L-glutamik asit ilavesi ya da monosodyum glutamat (MSG) kullanıldığı görülmektedir (Cataldo, Villegas, Savoy de Giori, Saavedra, & Hebert, 2020; Villegas, Brown, Savoy de Giori, & Hebert, 2016). MSG, hidroliz yoluyla L-glutamik asit üretebildiği için GABA üretiminde kullanımı tercih edilmektedir (Cui vd., 2020). Son yıllarda yapılan çalışmalarda glutamat ve glutamine (Mazzoli vd., 2010) ilaveten klorür (Laroute vd., 2021), arginin ve malat (Laroute vd., 2016) kullanımının GABA üretimini artırabileceği belirtilmiştir.

Glutamik asit ekşi mayalı ürünlerde bulunmaktadır ve laktik asit bakterilerinin başlangıç kültürü olarak kullanıldığı ürünlerde uygulanan fermentasyon ile LAB tarafından GABA' ya dönüştürülür ve GABA miktarı artar. Bu durum fermente üründe MSG kullanımı ile değişmektedir. MSG ilave edilmeden elde edilen fermente ürünlerdeki GABA miktarı MSG ilave edilen ürünlerdeki GABA miktarından daha az olmaktadır (Ratanaburee vd., 2013; Sanchart, Rattanaporn, Haltrich, Phukpattaranont, & Maneerat, 2017a; Villegas vd., 2016).

Araştırmanın Amacı

Bu tez kapsamında ise geleneksel ekşi mayalı hamurlardan izole edilen, γ -aminobütirik asit üretim yeteneğine sahip laktik asit bakteri identifikasyonu sağlanarak, MSG, pH ve NaCl değişkenleri ile GABA üretim koşullarının yanıt yüzey yöntemi ve Box – Behnken deney tasarımı ile optimizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi

GABA sağlıklı insan bedeninde yeterli düzeyde üretilebilen bir non-protein bir aminoasittir. Fakat bazı hormon eksiklikleri, vitamin ve mineral yetersizlikleri varlığında ya da

beslenme kaynaklı ortaya çıkan birikimler nedeni ile GABA üretimi engellenebilmektedir. Bu nedenle insan beslenmesinde GABA içeren gıdaların varlığı önem kazanmıştır. Gıda tüketiminde fonksiyonel özellik kazandırılabilen gıdalardan olan fermente gıdaları kaynak olarak kullanabilmektedir. Çoğunlukla GRAS statüsünde yer alan LAB gıdaya birçok fonksiyonel özellik kazandırabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada GABA üretim yeteneğine sahip laktik asit bakterisinin tanımlanması, tanımlanan bu bakterinin kullanılabileceği ortamlar hakkında fikir sahibi olabilmek için teknolojik özelliklerin tespitini ve gıdaya kazandırabileceği fonksiyonel özelliklerin tespitine gidilmiştir. Fermente gıdalar asitli ve genellikle tuz içeriği yüksek gıdalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu özelliklere dikkat edildiğini *L. brevis* AK19B suşunun MSG, pH ve NaCl değişkenleri varlığında GABA üretiminin optimizasyonu GABA'ca zengin gıdaların elde edilebilmesine öncülük edebileceği düşünülmüştür.

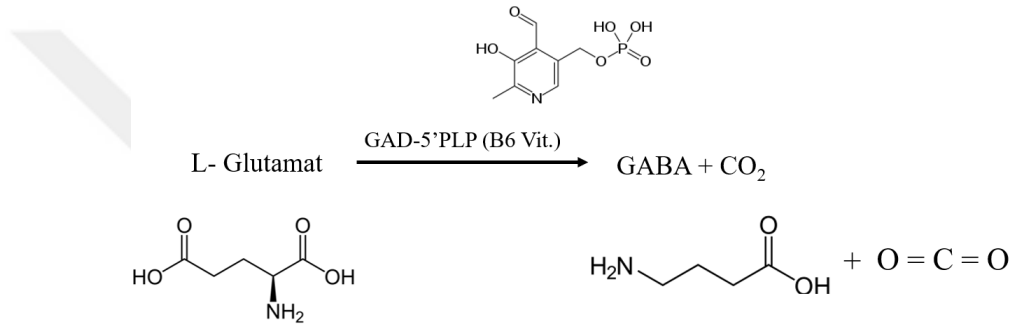


İKİNCİ BÖLÜM

Kuramsal Çerçeve ve Alan Yazın Derleme

Kuramsal Çerçeve

GABA doğada yaygın olarak bulunan, dört karbonlu, protein yapıda olmayan bir aminoasit olup merkezi sinir sisteminde inhibe edici nörotransmitter olarak görev yapmaktadır (Yunes *vd.*, 2016). Beyinde doğal yolla üretilebildiği gibi pirolin maddesinden yapay yolla da üretilebilmektedir (Yalçınkaya *vd.*, 2019, s. 2). GABA, L- glutamatın glutamat dekarboksilaz (GAD) enzimi tarafından katalizlenen geri dönüşümü olmayan dekarboksilasyonu sonucu üretilmektedir (Bown, & Shelp, 1997; Diana *vd.*, 2014).



Şekil 1. GAD ile katalizlenen L-glutamatın GABA dekarboksilasyonu.

GABA sinir sistemini baskılayıcı etkisinden dolayı dikkat çeken önemli bir postbiyotiktir (Diez-Gutiérrez, San Vicente, Barron, del Carmen Villaran, & Chávarri, 2020). GABA' nın bu etkisi GABA' ya özgü olan GABA_A, GABA_B ve GABA_C reseptörlerinden kaynaklanmaktadır (Sherwin, Sandhu, Dinan, & Cryan, 2016). Bu spesifik reseptörler sayesinde uyku bozuklukları ve gevşeme modüle edilebilir (Sigel, & Steinmann, 2012).

GABA ve sağlık üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda GABA' nın kardiyovasküler bozukluklar, kanser, epilepsi, depresyon, astım hastalıkları ve diyabet hastalıklarında faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi sinirsel hastalıkların gelişiminde GABA' nın önemi ortaya konmuştur (Diez-Gutiérrez *vd.*, 2020). Tablo 1.' de GABA' nın sağlık üzerine etkileri hakkındaki bazı çalışmalara yer verilmiştir. Yapılan çalışmalar GABA' nın yaygın hastalıkları önleme veya tedavi etme amacıyla kullanılabilecek önemli bir fonksiyonel bileşik olduğunu göstermektedir.

Tablo 1. *GABA' nın Sağlık Üzerine Etkileri*

Hastalık	GABA etkisi	Referans
Öğrenme ve hafıza bozuklukları	Zamansal ve mekânsal belleği geliştirme	(Diez-Gutiérrez vd., 2020)
Endişe ve depresyon	Rahatlatıcı ve antidepresan etki	(Bravo vd., 2011)
Astım	Bağışıklığı artırma, astım kontrolü	(Forkuo vd., 2017)
Huntington hastalığı	Nörotransmisyonu inhibe etme	(Hsu, Chang, & Chern, 2018)
Alzheimer hastalığı	Nörotransmisyonu inhibe etme	(Mele, Costa, & Duarte, 2019)

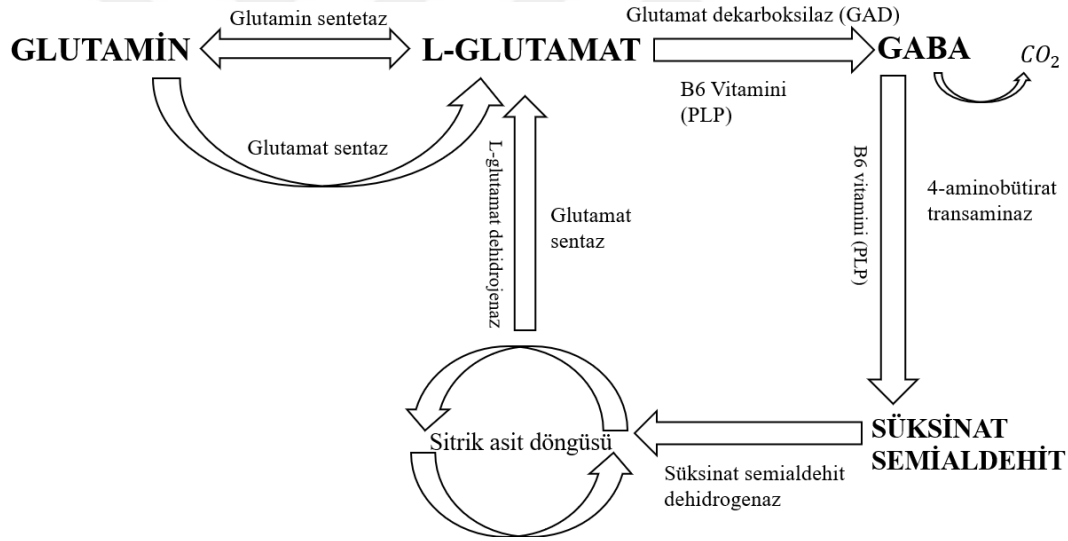
GABA, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Diez-Gutiérrez vd., 2020). Mikroorganizmalar içerisinde laktik asit bakterileri probiyotik karakterli olmaları sebebiyle dikkat çekmektedir (Nejati vd., 2013). Tablo 2.' de GABA üretim yeteneğinde olan fermente gıda kaynaklı bazı laktik asit bakterilerine yer verilmiştir.

Tablo 2. *GABA Üreten Laktik Asit Bakterileri ve İzole Edildiği Kaynaklar*

GABA üreticisi suş	İzole edilen kaynak	Referans
<i>Lactobacillus plantarum</i> K154	Kimchi	(Park, Lee, & Lim, 2014)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Kimchi	(Binh, Ju, Jung, & Park, 2014)
<i>Lactobacillus futsaii</i> CS3	Fermente karides (Kung-Som)	(Sanchart, Rattanaporn, Haltrich, Phukpattaranont, & Maneerat, 2017b)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Fermente adzuki fasulyesi	(Song, & Yu, 2018)
<i>Lactobacillus fermentum</i> YS2	Geleneksel Çin turşusu	(Lin, Li, & Qin, 2017)
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Tilsit peyniri	(Fröhlich-Wyder vd., 2015)

GABA' nın ana üreticisi olarak kabul edilen laktik asit bakterilerinin GABA üretim seviyeleri bakteri türüne göre farklılık göstermektedir. Bu durum GABA üretiminde etkili olan kültür koşullarının iyileştirilmesini elzem hale getirmiştir (Cui vd., 2020). GABA üretiminin optimizasyon çalışmalarının yanında genetik modifikasyonlar ile GABA üretiminin iyileştirilmesi ve veriminin artırılması, fizyoloji odaklı mühendislik stratejileri ile çevresel stresler ile bakteriyel GABA üretiminin artırılması ve ortak kültür mühendisliği ile birden fazla bakterinin aynı anda kullanılması ile üretimin artırılması gibi çalışmalar ile GABA üretimi ile türler arası görülen üretim farklılığı minimize edilebilir (Cui vd., 2020, s. 11-14).

Mikroorganizmalar tarafından GABA' nın biyosentezinde, gadC aracılığı ile L- glutamat hücreye taşınır. Kofaktör pridoksal 5-fosfat ile GAD tarafından L-glutamat katalize edilerek GABA oluşur ve yan ürün olarak CO₂ salınır. Dekarboksile GABA ekstraselüler matrikse aktarılır. L- glutamatın öncüsü a-ketoglutarat, sitrik asit döngüsü aracılığıyla glikozdan sentezlenir ve L-glutamat dehidrojenaz (GDH) ile L-glutamata dönüştürülür (Cui, vd., 2020, s. 2).



Şekil 2. GABA oluşum mekanizması (Akt., Yalçinkaya vd., 2019, s. 2).

Yüksek verimde GABA üretimi, üretimi etkileyen faktörlerin optimizasyonunun yanı sıra hücrelerdeki GAD enzimi aktivitesinin ve glutamik asit konsantrasyonunun yüksek olması ile de ilgilidir (Diana, Tres, Quílez, Llombart, & Rafecas, 2014). GAD, sitoplazmada bulunur, GABA üretimi için anahtar enzimdir, pH' dan etkilenir ve GAD genine (özellikle gadB ve/veya gadC) sahip olan laktik asit bakterileri GABA üretebilir. Yapılan bir çalışmada yüksek GABA üretim yeteneğine sahip *L. brevis* CD0817' nin gadB ve gadC genlerini içerdiği tespit edilmiştir (Gao vd., 2019). GAD aktivitesi laktik asit bakterilerinin türlerine ve suşa özgü olmakla birlikte pH 4,0-5,0' da optimum aktivitelerini gösterirken pH 7,0' de aktivitelerinde kayıp meydana gelir (Cui vd., 2020).

Alan Yazın Derlemesi

Geleneksel fermente gıdalardan izole edilen gelişme hızı ve asit üretme yeteneği gibi farklı fizyolojik özellikler sahip olan LAB suşlarının GABA üretim potansiyelleri de farklılık göstermektedir.

M.-J. Kim ve Kim, (2012) 20 farklı kaynaktan topladıkları geleneksel fermente bir gıda olan kimchi örneklerinden 68 GABA üreticisi izolattan 5 laktik asit bakteri türünü tanımlamışlar ve bu LAB izolatları arasında en iyi GABA üreten suşların *Lactobacillus brevis* KCD13, *Lactobacillus plantarum* KC-Q1, KC-R1 ve KC R36 olduğunu tespit etmişlerdir.

Geleneksel fermente balıktan (funa suşi) izole edilen *Lactobacillus paracasei*, kültür ortamına pridoksal 5-fosfat ilavesi ve ortam pH' sının 5 olarak ayarlandığı uygun gelişme koşullarında yüksek miktarda (> 300 mM) GABA ürettiği belirlenmiştir (Komatsuzaki vd., 2005).

J. Y. Kim vd., (2009) kimchi' den izole edilen *L. brevis* ile siyah ahududu suyunu fermente ederek sıcaklık ve pH değişiminin GABA seviyeleri üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmalarında, 25 °C' de fermente edilen meyve sularındaki GABA içeriği 15. günde en yüksek seviyeye ulaşmış fakat başlangıç pH' sı 6 olan meyve suyunun en düşük GABA (13,0 mg/mL) içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. 30 °C' de fermente edilen meyve suları 12. günde en yüksek GABA seviyesine ulaşmış ardından azalma göstermiştir. 37 °C' de ise en yüksek GABA seviyesi 15. günde tespit edilmiştir.

Lacroix, St-Gelais, Champagne, Fortin ve Vuillemard, (2010) Kanada eski tip peynirlerinden 13 suş tanımlamış ve her suşun *Lactococcus* cinsine ve *lactis* türüne ait laktik asit bakterilerinden olduğunu, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ULAAC-A23 ve *Lc. lactis* ssp. *lactis* ULAAC-H13 suşlarının yüksek GABA üretim potansiyeli gösterdiğini tespit edilmiştir.

M. Nomura, Kimoto, Someya, Furukawa ve Suzuki, (1998) dokuz karışık başlangıç kültürü kullanarak elde ettikleri peynir örneklerinin tümünde GABA tespit ettiklerini ancak en yüksek GABA içeriğinin *Lc. lactis* ssp *lactis* 712 ile yapılan peynir örneğinde olduğunu, ilaveten peynirin olgunlaşması sırasında pH değerinin düştükçe GABA içeriğinin doğrusal olarak arttığını gözlemlemişlerdir.

Lin, Li ve Qin, (2017) geleneksel Çin turşusundan GABA üretim potansiyeline sahip *Lactobacillus fermentum*' u izole etmişlerdir. Ayrıca çalışmada MSG kullanılmış ve MSG' nin GABA' ya dönüşümünü GAD' ın başarılı bir şekilde katalizlediğini göstermişlerdir.

Park ve Oh, (2007) başlangıç kültürü olarak laktik asit bakterilerinin kullanıldığı soya sütünden yoğurt üretimi gerçekleştirdikleri çalışmalarında, *L. brevis* OPY-1 tarafından üretilen GABA' nın 2,5 g/L' nin üzerinde olduğunu belirlemişlerdir.

Li, Qiu, Chen ve Cao., (2011) GABA' yı fermente et suyundan ayırmayı amaçladıkları çalışmalarında ilk olarak *L. brevis* NCL912 ile beslemeli kesikli fermantasyon yoluyla fermente bir et suyu hazırlamışlardır. Çalışma sonunda yüksek GABA içeriğine sahip (997 ± 51 mM) fermente et suyundan $\%98,66 \pm 2,36$ saflıkta GABA ayırımını sağlamışlardır.

Başka bir çalışmada Tay fermente domuz sosisinde biyojen aminleri ve kolesterolü düşürmek amacıyla GABA üretim yeteneğine sahip *Pediococcus pentosaceus* HN8 ve *Lactobacillus namurensis* NH2 bakterilerini başlangıç kültür olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kullanılan başlatıcı kültürlerin GABA seviyelerinde meydana gelen artışla biyojen amin ve kolesterol miktarının önemli ölçüde azalma gösterdiği belirlenmiştir (Kantachote, Ratanaburee, Sukhoom, Sumpradit, & Asavaroungpipop, 2016).

Laroute vd., (2021) *Lactococcus lactis* NCDO 2118' deki GABA üretiminde çevresel faktörlerin etkilerini inceledikleri çalışmalarında farklı ozmolaritelerde iyonik (tuz) ve iyonik olmayan (polioller) streslerin bakterinin gelişimi ve GABA üretimi üzerinde çeşitli etkilere sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada ayrıca *L. lactis* NCDO 2118' in ortama 152 mM glutamat ilavesi ve pH ayarlanması ile GABA üretim seviyesi de araştırılmıştır. *L. lactis* NCDO 2118' in 56 saat sonra 413 mM (42,6 g/L) GABA ürettiği tespit edilmiş ve elde edilen 413 mM' lık GABA' nın bu suş kullanarak elde edilmiş en yüksek GABA verimi olduğunu da belirtmişlerdir.

GABA üretiminde etkili olan faktörlerin optimize edilmesiyle GABA verimi en yüksek seviyede elde edilebilir (Yalçınkaya vd., 2019). Bunun için literatürde bazı çalışmalar bulunmaktadır. Song ve Yu, (2018) fermente adzuki fasulye sütünde GABA verimini artırmak için fermantasyon koşullarını optimize etmiştir. *L. rhamnosus* GABA üretimi için inoküle edilmiş ve fermantasyonun 36. Gününde GABA içeriğinin 0,05 mg/mL' den 0,44 mg/mL' ye artış gösterdiğini, MSG, galaktoz ve pridoksin ilavesinin GABA içeriğini düzenli bir artış ile artırdığını ve optimum koşullarda üretilen GABA miktarının kontrol grubuna kıyasla (0,05 mg/100 mL) yaklaşık 22,4 kat artarak 1,12 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

S. J. Park vd., (2020) pirinç kepeğinden izole ettikleri *L. plantarum* EJ2014 ile GABA üretimi için fermantasyon ortam koşullarını optimize etmişlerdir. Çalışmada GABA üretimi için; maya ekstraktı konsantrasyonunun etkisi, glikoz oranının etkisi ve farklı MSG konsantrasyonlarının etkisi araştırılmış ve sonuçlardan yola çıkılarak optimum koşullar

oluşturulmuştur. *L. plantarum* ile en yüksek verimli (19,8 g/L) ve basit GABA üretiminin 100 g/L maya ekstraktı, 10 g/L glikoz ve 22,5 g/L (w/v) MSG içeren besiyeri kullanılarak gerçekleştirilebileceğini tespit etmişlerdir.

Kwon ve Lee, (2018) yaptıkları çalışmada yüksek miktarda GABA üretimi için fermentasyon koşullarını optimize etmişlerdir. *Lb. plantarum* EJ2014 ile 30 °C' de 7 gün, %0,5 ve %1,5 glikoz ve %3,5 MSG varlığında fermentasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve fermentasyonun 3. gününde asitliğin önemli seviyede azalmasıyla ve MSG' nin verimli bir şekilde dönüştürülmesiyle %1,4 GABA üretimi gözlemlenmiştir.

Lin, (2013) çalışmasında Çin geleneksel fermente sebze turşusundan izole edilen bir tür olan *Lb. rhamnosus* YS9 ile GABA üretimi için fermentasyon koşullarını incelemiştir. Kültür pH koşulu, GAD aktivitesinin optimal pH' sına ayarlandığında, fermentasyon ortamına 200 mM MSG ve 200 µM PLP ilave edildiğinde *Lb. rhamnosus* YS9' un 187 mM GABA ürettiğini tespit etmiştir.

Binh, Ju, Jung ve Park, (2014) tarafından GABA verimini artırmak amacıyla GABA üretim yeteneğine sahip *Lb. brevis* K203 kimchi' den izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. GABA üretimi için; sıcaklık, pH, L-glutamik asit konsantrasyonu, MSG konsantrasyonu, karbon kaynağı, tuz konsantrasyonu vb. etkenlerin optimizasyonu araştırılmıştır. Çalışmada *Lb. brevis* K203 tarafından optimum GABA üretimi için optimal koşullar; %6 (w/v) glutamik asit, %4 (w/v) maltoz, %1 (w/v) et ekstraktı, %0,5 (w/v) maya ekstraktı, %1 (w/v) kazein pepton, %1 (w/v) NaCl, %1 (w/v) CaCl₂, 0,02 mM PLP, 2 mL Tween 80/1 ve 37 °C sıcaklık olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 72 saat inkübasyon sonunda 44,4 g/L GABA üretimi gerçekleştirilmiş ve %97 saflıkta GABA kazanımı gerçekleştirmişlerdir.

Villegas vd., (2016) kinoa ekşi hamurundan izole edilen ve GABA üreten laktik asit bakterilerinin fermentasyon koşullarının optimize ettiği çalışmalarında, GABA üretimi için; MSG konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve sıcaklığı gibi koşullar optimize edilmiştir. Artan MSG konsantrasyonu ile GABA üretim veriminin kademeli bir şekilde arttığı ve *L. brevis* CRL 1942 53 mM MSG' yi GABA' ya dönüştürmede en etkili suş olarak belirlenmiştir. Ayrıca 30 °C' de 48 saatlik bir inkübasyon ile MSG' nin yaklaşık %90' ının GABA ya dönüşümü ve maksimum üretimin gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Lim, Cha, Roh, Shin ve Seo, (2017) *L. brevis* HYE1'in GABA üretimi üzerine; başlangıç pH' sı, MSG miktarı, azot ve karbon kaynaklarının çeşidi gibi kültür koşullarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada en iyi karbon kaynağı 3,04 mM GABA üretimi sağlayan maltoz olarak belirlenmiş ve en iyi azot kaynağının ise tripton içeren besiyerinde maksimum

GABA üretimi 16,47 mM olarak bulunmuştur. Çalışma sonunda maksimum GABA üretimi (18,76 mM) için optimum kültür koşullarının; %2,38 (w/v) MSG, %4,01 (w/v) tripton, %12,14 (w/v) maltoz ve başlangıç pH' ısı 4,74 olarak önerilmiştir.

Li, Qiu, Gao ve Cao, (2010) *L. brevis* NCL912 ile yaptıkları optimizasyon çalışmasında karbon kaynakları, nitrojen kaynakları, tween 80'in ve CaCl₂, V_{B6}, V_C, MgSO₄.7H₂O ve MnSO₄.4H₂O gibi diğer faktörlerin yüksek verimde GABA üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Box-Behnken metodu ile koşullar 55,25 g/L glikoz, 30,25 g/L soya peptonu, 0,0064 g/L MnSO₄.4H₂O ve 1,38 mL/L tween 80 olarak belirlenmiş ve 349,69 mM GABA üretimi tahminlenmiştir. Bu koşullarda yapılan üretim sonucunda yüksek verimde (345,83 mM) GABA üretimi yapılmıştır. Elde edilen bu sonuç deneysel ve tahmin edilen değerlerin uyum içinde olduğunu göstermektedir.

Alizadeh Behbahani, Jooyandeh, Falah ve Vasiee, (2020) *L. brevis* A3 ile GABA optimizasyonu çalışılan araştırmada, optimum üretimin %14,96 peynir altı suyu, %4,95 MSG ilavesi, 37 °C sıcaklık ve 48 saat inkübasyon sonucunda 553,5 ppm GABA üretimi belirlenmiştir. Ayrıca bakterinin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Zareie, Yazdi ve Mortazavi, (2019) *L. brevis* tarafından en yüksek verimde GABA üretimi için merkezi kompozit tasarımını kullanarak fermentasyon koşulları optimize edilmiştir. GABA üretiminin optimum koşulları; %5 soya protein izolatu, %3 inülin ve 37 °C' de 96 saat inkübasyon olarak belirlenmiş ve bu koşullarda üretim neticesinde 1473,44 ppm düzeyinde GABA elde etmişlerdir.

Falah, Vasiee, Alizadeh Behbahani, Tabatabaee Yazdi ve Mortazavi, (2021) Yanıt yüzey yöntemini kullanarak *L. brevis* PML1 ile gıda biyo-ürünü içeren ortamda GABA üretimini optimize etmişlerdir. %14,77 süt harcı tozu, %6,27 soya fasulyesi küspesi, %0,49 amonyum sülfat ve 32 °C' de yapılan 120 saatlik inkübasyon sonucunda 300 ppm GABA üretimi tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca *L. brevis* PML1' in antioksidan, antimikrobiyal ve toksisite özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada öncesinde ekşi hamurdan izole edilmiş olan laktik asit bakterileri GABA üretim yetenekleri açısından incelenmiştir.

Yöntem

GABA üretim yeteneğine sahip izolatların tespit edilmesi.

Tez çalışması kapsamında öncesinde izolasyonu yapılmış olan ekşi hamur kaynaklı 30 adet LAB suşunun GABA üretim yeteneklerini tespit etmek amacıyla aktif olan kültürler kullanılarak, 53 mM monosodyum glutamat içeren MRS ortamında 37 °C’ de 96 saat süre ile inkübasyon sağlanmıştır. Süre sonunda 5000 rpm’ de 15 dk santrifüj işleminin ardından süpernatant GABA üretiminin tespiti amacıyla saklanmıştır. Süpernatant fraksiyonları İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile değerlendirilmiştir. TLC tabakası üzerine monosodyum glutamat ve GABA standartları ile suşlara ait süpernatantlar 2 µl hacimde damlatılmıştır. Sonrasında bütanol: asetik asit: distile su (4: 1: 1) içeren ortama daldırılarak, fraksiyon ayrımı için 2 saat bekletilmiştir. Fraksiyonların görüntülenebilmesi amacıyla %0,4 (w/v)’ lük ninhidrin çözeltisi püskürtülerek ısı uygulanmıştır. Bantlar pembe renk değişimi ile tespit edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması.

Daha önceden izolasyonu yapılmış saf kolonilerin morfolojik yapıları, mikroskopik görünimleri belirlenip Gram boyama ve katalaz testleri uygulanmıştır. Laktik asit bakterilerinin Gram pozitif, katalaz negatif ve kok veya çubuk şekilli oldukları göz önünde bulundurularak seçilen kültürler ileri tanı testleri için gliserol (%40) ve MRS sıvı besiyeri içeren tüplerde -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Moleküler tanılama.

Bakteri suşunun moleküler karakterizasyonu genomik DNA izolasyon kiti (EcoTech-EcoPURE Genomic DNA Kit) kullanılarak aşağıda verilen protokol çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

1. 1 mL bakteri kültürü 1,5 mL’ lik santrifüj tüpüne alınır, karıştırılır. 5000 rpm de 3 dk oda sıcaklığında santrifüj edilir. Süpernatant mikropipet ile uzaklaştırılır.

2. Bakteri peletine 200 µL Resuspension Buffer eklenir ve hücre kütlesi kalmayıncaya kadar karıştırılır.
3. 200 µL Lysis Buffer eklenir ve iyice karıştırılır.
4. 20 µL Proteinaz K eklenir ve iyice karıştırıldıktan sonra 55 °C' de su banyosunda 30 dk inkübe edilir.
5. 400 µL Binding Buffer eklenir ve iyice karıştırılır.
6. Karışım toplama tüpüne alınır, ecospin columbu toplama tüpüne yerleştirilir ve 5. adımdan itibaren 1 dk oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüjlenir.
7. Sıvı kısım dökülür ve 500 µL Wash Buffer eklenir. Maksimum hızda oda sıcaklığında 30 sn santrifüjlenir.
8. Sıvı kısım dökülür ve 200 µL Wash Buffer eklenir. Maksimum hızda 2 dk yıkama tamponu çıkıncaya kadar santrifüjlenir.
9. Column 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüpüne alınır.
10. 30-50 µL Elution Buffer' ı column tam merkezine (membranın merkezine) eklenir ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
11. Maksimum hızda oda sıcaklığında 30 sn santrifüjlenir.
12. Ecospin sütunu atılır ve saflaştırılan DNA -20 °C' de muhafaza edilir.

16s rRNA analizi.

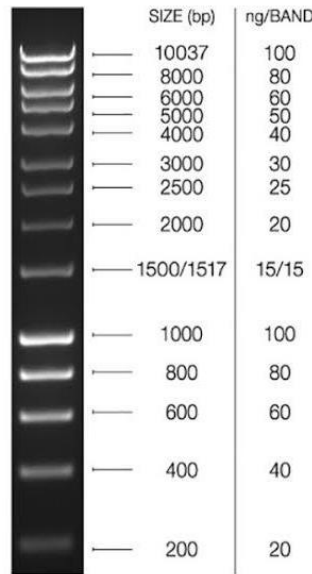
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) planı: Toplam hacim 25 µL olacak şekilde ayarlanmıştır: 18,9375 µL steril saf su, 2,5 µL buffer, 10 mM 2 µL dNTPs, 0,5 µL AMP-F (GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG) 20 µM, 0,5 µL AMP-R (AAGGAGGTGATCCARCCGCA) (Y: C veya T; R: A veya G) 20 µM, 0,0625 µL DreamTaq DNA Polymerases (Thermo Fisher Scientific) ve 0,5 µL Template DNA. Analizde uygulanan PZR programı Tablo 3.' de verilmiştir.

Tablo 3. PZR Programı

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Denatürasyon	95 °C	2 dk	x1
Denatürasyon	95 °C	30 sn	
Bağlanma	50 °C	20 sn	x25
Uzama	72 °C	30 sn	
Son uzama	72 °C	5 dk	x1

PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.

PZR ürünlerinin jel elektroforezinde görüntülenmesinde 0,5X Tris Borat EDTA (TBE) tamponu kullanılarak %1 konsantrasyonda hazırlanan agaroz jel kullanılmıştır. PZR ürünleri agaroz jele yüklenmeden önce yükleme tamponu ile boyanmıştır. Boyama işlemi için parafilm üzerine 2 µL yükleme tampon boyasından koyulup üzerine 10 µL örnek aktarılarak otomatik pipet ile karışımı sağlanmıştır. Renklendirilen numuneler %1' lik agaroz jele yüklenmiştir. Jel TBE tamponu içerisine yerleştirilmiş ve 50 dakika boyunca 100 volt elektrik akımı verilerek elektroforez işlemine başlanmıştır. Elektroforez işleminin ardından jel 1 mg/L' lik etidyum bromür çözeltisi içerisinde 15 dk bekletilerek jelde yüklü DNA parçacıklarının boyanması sağlanmıştır. Ardından jel deiyonize su içine daldırılmış ve UV-Transilluminatör kullanılarak UV ışık altında görüntülenmiştir. DNA boyutlayıcısı olarak Şekil 3.' de verilen Hyperladder I (Bioline, İngiltere) kullanılmıştır (Ispirli, 2020, s. 36).



Şekil 3. Hyperladder I (Bioline, İngiltere) fragment boyutları ve miktarları.

PZR ürünlerinin sekans analizi ve değerlendirmesi.

Elde edilen PZR ürününün sekans analizi BMLabosis (ANKARA) tarafından yapılmıştır. Analiz sonucu değerlendirilmesinde BioEdit 7.2 programından faydalanılmıştır.

GABA üretim miktarlarının HPLC ile tespit edilmesi.

GABA içeriği, bir Inertsil ODS 3 kolonu (GL science, 5 µm, 4.6 x 250 mm) ile donatılmış bir HPLC (Shimadzu) sistemi kullanılarak 295-500 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Mobil faz olarak solvent A (6,25 mL asetik asit, 1,97 g sodyum asetat, 200 mL asetronitril, 1 L ultra saf su) ve solvent B (Asetronitril) kullanılmıştır (1:1, v/v). Örneklerden 1 µL enjeksiyon yapılmıştır. 25 °C' lik bir kolon sıcaklığında 1 mL/dk akış hızında ayırım sağlanmıştır. Türevlendirme işlemi ile moleküllerin değişerek HPLC de farklı zamanlarda farklı yerde oluşturduğu pikler ile bileşenlerin ayırımı sağlanmaktadır. Bu amaçla 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) eklenir ve 40 °C'de 30 dk ultrasonik (%75) su banyosunda bekletilir. Süre sonunda elde edilen berrak sıvıdan sarsmadan HPLC vialine 500 µL alınır ve 500 µL metanol eklenerek analize hazır hale getirilmiştir. Türevlendirilen GABA' dan dolayı oluşan foton diyot dizisi floresan dedektörü tarafından tespit edilmiştir. GABA idendifikasyonu, standart olarak kullanılan GABA' nın (Sigma-Aldrich) alıkonma süreleri ile örneklerin alıkonma süreleri karşılaştırılarak yapılmıştır. Örneklerde bulunan GABA konsantrasyonlarını belirlemek için, farklı konsantrasyonlarda (0,01-0,1-0,25-0,50-1,0 mg/mL) hazırlanan standartların test edilmesi ile LAB suşunun süpernatantındaki GABA seviyesi belirlenmiştir (Tuberoso, Congiu, Serreli, & Mameli, 2015, s. 2).

Laktik asit bakterilerinin tekno-fonksiyonel özelliklerinin tespit edilmesi.

Faklı pH değerinde gelişmenin belirlenmesi.

İzolatin farklı pH' larda gelişiminin incelenmesi için farklı pH değerlerine (pH 4, 5, 8) sahip MRS sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri pH' sının ayarlanmasında 5N NaOH ve 5N HCl kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine 24 saatlik kültürden 0,1 mL inoküle edilerek 30 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede (UV-1800, UV Spectrophometer, Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) 600 nm' de köre karşı absorbans ölçümü ile gelişim üzerine pH' nın etkisi belirlenmiştir (Sifeeldein vd., 2018, s. 124). Sonuçlar absorbans değerlerine göre zayıf, iyi ve çok iyi (Zayıf ≤ 1,0 İyi = 1,1-1,5 Çok İyi ≥ 1,5) olarak değerlendirilmiştir.

Farklı sıcaklıklarda gelişmenin belirlenmesi.

Suşun farklı sıcaklıklarda gelişiminin incelenmesi için hacmi 5 mL' lik MRS sıvı besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine 24 saatlik kültürden 0,1 mL inoküle edilip besiyerleri 4 °C' de 7 gün, 25 °C' de 2 gün ve 45 °C' de 3 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 600 nm' de köre karşı absorbans ölçümü yapılarak gelişim üzerine sıcaklığın etkisi belirlenmiştir (Drosinos vd., 2005). Sonuçlar absorbans değerlerine göre zayıf, iyi ve çok iyi ($Zayıf \leq 1,0$ İyi = 1,1-1,5 Çok İyi $\geq 1,5$) olarak değerlendirilmiştir.

Yüksek tuz konsantrasyonunda gelişmenin belirlenmesi.

LAB suşunun NaCl' ye karşı toleransını belirlemek için %7, 10 ve 15 oranında NaCl içeren MRS sıvı besiyerleri (10 mL) hazırlanmıştır. Hazırlanan MRS sıvı besiyerine 100 µL kültür eklenmiş ve 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 600 nm' de absorbans ölçümü yapılmıştır (Escamilla-Montes vd., 2015, s. 13). Sonuçlar absorbans değerlerine göre zayıf, iyi ve çok iyi ($Zayıf \leq 1,0$ İyi = 1,1-1,5 Çok İyi $\geq 1,5$) olarak değerlendirilmiştir.

Termotolerant kapasitesinin belirlenmesi.

İzole edilen laktik asit bakteri suşu Pérez-Chabela, Totosa ve Guerrero, (2008) tarafından belirlenen metoda göre termotolerant kapasitesi açısından incelenmiştir. Öncelikle kültür 10 mL MRS sıvı besiyerinde çoğaltılıp 24±2 saat boyunca 37 °C' de optik yoğunluk 650 nm' de yaklaşık 1 oluncaya kadar inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler dik bir biçimde 70 °C' de 60 dk boyunca su banyosunda tutulmuştur. Bu işlemten sonra 1 mL alınarak MRS agar plaklarına ekim yapılmış 37 °C' de 24 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra >300 kob/mL seviyesinde laktik asit bakterisi içeren petri plaklarındaki suşlar termotolerant olarak kabul edilmiştir.

Safra tuzuna direncin belirlenmesi.

Düşük pH ve safra tuzu direncinin değerlendirilmesi amacı ile LAB suşu aerobik şartlar altında bir gece geliştirildikten sonra %0,85' lik fizyolojik tuzlu su ile iki defa yıkanmıştır. Ardından bütün suşlar OD600 nm' de 1'e ayarlanmıştır. Kontrol amaçlı pH ayarlaması yapılmadan ve safra tuzu ilave edilmeden kültürler MRS ortamına %1 oranında inoküle edilmiştir. Aynı şekilde yine %0,3 (w/v) safra tuzları içeren (Bovine bile, Sigma) ve 1 M HCl ile pH 4'e ayarlanmış MRS ortamlarına kültürden %1 olacak şekilde inoküle edilmiştir. Bu işlemler cam tüp içerisinde gerçekleştirilerek sarsmadan 37 °C inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra belirli saatler boyunca spektrofotometre (UV-1800, UV Spectrophotometer, Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) de OD600 ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen değerlerden hareketle gelişim eğrisi oluşturulmuş ve suşun dirençlilik değerlendirilmesi yapılmıştır.

Mide ortamına direncin belirlenmesi.

LAB suşunun asit ve safra toleransı S.-M. Lim ve Im, (2009) tarafından belirlenen yöntemin modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Mide ortamındaki dayanıklılığının belirlenmesi amacıyla MRS ortamında 37 °C’ de bir gece geliştirilen bakteri kültüründen hücrelerinin ayrılması için oda sıcaklığında 5000 rpm de 15 dk santrifüj uygulanmıştır. Ardından hücreler %0,85’ lik fizyolojik tuzlu su ile iki defa yıkanmıştır ve yeniden fizyolojik tuzlu su içinde süspanse edilmiştir. Kontrol amaçlı pH ayarlaması yapılmayan ve pepsin ilave edilmeyen MRS ortamına kültürden %1 olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. Aynı şekilde 3 mg/mL pepsin içeren ve 5 N HCl ile pH 2,5’ e ayarlanmış 10 mL’ lik kültür ortamına kültürden %1 olacak şekilde inokülasyon yapıldı. Bu işlemler cam tüp içerisinde gerçekleştirilerek sarsmadan 37 °C 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültürün canlı hücre sayımı için MRS agar besiyerine inkübasyon sonrası kültürden ve yıkama sonrası kültürden spot yöntemi ile üç paralelli ekim yapılmıştır. Anaerobik ortamda 37 °C’ de 48 saat inkübasyondan sonra canlı hücre sayımı yapılmıştır.

Hücre yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi.

Hidrofobisite mikroorganizmaların hidrokarbonlara tutunma özelliği olarak tanımlanır (Kotzamanidis, Kourelis, Litopoulou-Tzanetaki, Tzanetakis, & Yiangou, 2010, s. 156). MRS ortamında 37 °C’ de bir gece geliştirilen *L. brevis* hücrelerinin ayrılması için oda sıcaklığında 5000 rpm de 15 dk santrifüj uygulanmıştır ve sabit fazda bakteri hücreleri 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra optik yoğunluk (600 nm’ de) 0,6-0,7’ ye ulaşınca dek (5 mL) PBS (Fosfat Tamponu Solüsyonu, pH: 7,2) ile yeniden süspanse edilmiştir (10⁸ kob/mL bakteri içeren PBS) (A₀). Yıkanan hücre süspansiyonunun 3 mL’ sine 1 mL hidrokarbon eklenmiştir. 23 °C’ de 10 dk ön inkübasyondan sonra 2 fazlı sistem 2 dk karıştırılmıştır. Daha sonra 23 °C’ de 20 dk bekletilmiştir. Sulu faz dikkatli bir şekilde ayrılmış ve 600 nm’ de absorbansı ölçülmüştür (A₁). Analizde hidrokarbon olarak n-hekzan kullanılmıştır. Hücre yüzey hidrofobisitesi eşitlik (1)’ e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre yüzey hidrofobisitesi (\%H)} = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

Antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesi.

Antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesi amacıyla indikatör mikroorganizma olarak Tablo 4.' de yer alan patojen bakterilerden yararlanılmıştır. İzolatın indikatör patojenlere (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*) karşı antibakteriyal aktiviteleri agar-spot testi ile (Spelhaug, S. R., & Harlander, S. K., 1989) belirlenmiştir.

MRS sıvı besiyerinde geliştirilen izolat MRS agar plaklarının üzerine 10 µL hacimde damlatılarak anaerobik koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 1 gecelik patojen bakteri içeren Tryptic Soy Broth (TSB-Tryptic Soy Broth, Merck) içerisinde geliştirilmiş kültür, %0,7 oranında agar içeren TS yarı katı agar (katılaşma sıcaklığının üstünde) ortamına aktarılmıştır. Patojen bakteri içeren yarı katı agar karıştırıldıktan sonra laktik asit bakterisi içeren MRS agar tabakaları üzerine dökülmüştür. Yarı katı agarın katılaşmasının ardından aerobik koşullarda 37 °C' de 24 saat inkübasyon sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında laktik asit bakteri gelişim alanının dışında gözlenen berrak zon çapları ölçülerek, antibakteriyal etki tespit edilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan İndikatör Mikroorganizmalar

Suş kodu	Tür
P12	<i>Escherichia coli</i> BC 1402
P60	<i>Bacillus cereus</i> BC 6830
P78	<i>Salmonella typhimurium</i> RSSK 95091
P91	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 27729
P94	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923

Antifungal aktivitenin belirlenmesi.

Aspergillus niger ve *Penicillium chrysogenum* küfleri 30 °C' de Potato Dextrose Agar (PDA, MERCK, Darmstadt) katı besiyerinde 7 gün süre ile geliştirilmiştir. Steril H₂O kullanılarak, küf sporları yıkanmış ve süspansiyonları hazırlanmıştır.

MRS katı besiyeri üzerine 10 µL hacimde spotlanan bir gecelik LAB suşu anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. 24 saat 30 °C' de inkübasyonun ardından, petriler 10⁶ spor / mL içeren PDA yarı katı besiyeri (%0,8 agar) ile kaplanmıştır. 30 °C' de 36 saat aerobik olarak inkübe edilen petrilerde gözlenen zon çapları ölçülerek antifungal aktivite tespit edilmiştir.

Antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi.

L. brevis suşu bir gece geliştirilerek ($\sim$ hücre sayısı 10^7 kob/mL) ve 100 μ L hacimde MRS agara yayma yöntemi inoküle edilmiştir. Ardından antibiyotik diskler (vankomisin (30 μ g), streptomisin (10 μ g), ampisilin (10 μ g), eritromisin (15 μ g), tetrasisin (30 μ g), penisilin G (10 μ g), kanamisin (30 μ g), oksasilin (1 μ g), gentamisin (10 μ g) ve kloramfenikol (30 μ g)) petri plakalarına yerleştirilmiştir. Antibiyotik (OXOID Antimicrobial Susceptibility Test Discs) uygulanan petriler 37 °C’ de 24 saat geliştirilerek oluşan inhibisyon zonları kaydedilmiştir. Böylelikle LAB türlerinin antibiyotik hassasiyeti belirlenmiştir.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi.

LAB suşu 37 °C’ de 24 saat geliştirilmiştir. Ardından 1 mL 24 saatlik izolat içeren MRS ortamına 1 mL 0,2 mM 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) çözeltisi (metanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır) ilave edilmiştir. % inhibisyonu belirlemek amacı ile kontrol olarak örnek yerine su kullanılmıştır. Karıştırma işleminin ardından oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika süre ile bekletilen örnekler 1400 x g’ de 10 dakika santrifüjlenip 517 nm’ de saf metanole karşı absorbans ölçümü yapılmıştır. %serbest radikal değeri (eşitlik (2)) hesaplanarak antioksidan aktivite belirlenmiştir.

$$\%Serbest\ radikal = (A_0 - A_s) \times 100 \quad (2)$$

A_0 : Körün absorbansı

A_s : Numunenin absorbaansı

Fitaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi.

Fitaz enzimi aktivitesinin belirlenmesinde Choi, Suh ve Kim, (2001)’ in kullandıkları yöntemden faydalanılmıştır. MRS sıvı besiyerinde geliştirilen kültürden 10 mL alınarak 4 °C’ de 5000 rpm de 15 dakika santrifüj edilerek enzim içeren sıvı kısım ve hücre peleti birbirinden ayrılır. Analizde 4 adet örnek tüp ve 1 adet kontrol (kör) tüpü kullanılmıştır. Her bir örnek tüpüne 900 μ L substrat çözeltisi, kör tüpüne 750 μ L Trikloro asetik asit (TCA) çözeltisi eklenir ve 37 °C’ lik su banyosunda 5 dk inkübe edilir. Substrat içeren örnek tüplerine 100 μ L enzim çözeltisi, kör tüpüne de 100 μ L TRIS-HCl (pH 7) tamponu eklenir. 37 °C de 30 dk inkübe edilir. İnkübasyon sonunda örnek tüplerine 750 μ L TCA çözeltisinden, kör tüpüne ise 900 μ L substrat çözeltisinden eklenir ve tüpler iyice karıştırılır. Elde edilen karışıma %5,5 sülfirik asit ile hazırlanan %2,5 amonyum molibdattan 1500 μ L, %2,5 ferroz sülfat renk reaktifinden 1500 μ L eklenir ve örneklerin absorbansı 700 nm’ de köre karşı belirlenir.

Enzim aktivitesi miliünite (mU) cinsinden hesaplanmıştır ve standart deney koşullarında dakikada 1 nanomol fosfatın serbest bırakılmasını sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

Enzim aktivitesi analizinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.

0,1 M TRIS-HCl Tamponu (pH 7.0): 12,11 g Tris tartılır ve 500 mL saf su ile seyreltilir. Çözelti 2 N HCl ile pH 7.0' a ayarlanır. Son hacim 1 L' ye tamamlanır.

%5' lik TCA çözeltisi: 5 g TCA tartılır ve saf suyla 100 mL' ye tamamlanır.

Substrat çözeltisi: 50 mL 0,1 M TRIS-HCl çözeltisi içerisine 2 mM Na-fıfat karıştırılır (Y.-O. Kim, Kim, Bae, Yu, & Oh, 1998).

Renk çözeltileri: Renk ayracı 1 ve 2 çözeltileri ile sırasıyla 4:1 oranında hazırlanır.

Çözelti 1: %5,5 sülfirik asit ile hazırlanan %2,5 Amonyum molibdat

90,5 mL' lik saf suya 5,5 mL sülfirik asit ilave edilir ve 2,4 g amonyum molibdat tartılarak çözeltiye eklenir.

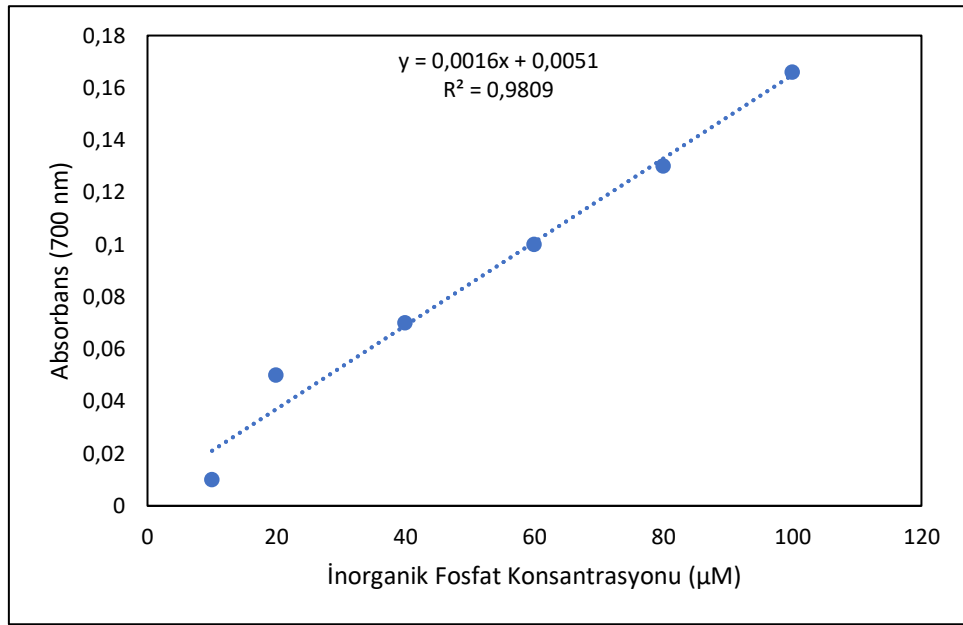
Çözelti 2: %2,5' lik Ferroz sülfat

2,5 g ferroz sülfat tartılır ve saf suyla 100 mL' ye tamamlanır. Günlük olarak hazırlanması gerekmektedir.

KH₂PO₄ substratı hazırlanışı: 0,14 g KH₂PO₄ tartılır ve 100 ml saf su eklenir.

İnorganik fosfat standart grafiği ve hazırlanışı.

İnorganik fosfat miktarının belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda (0-100 µM) standart KH₂PO₄ çözeltileri hazırlanmıştır. İnorganik fosfat miktarı 700 nm' de köre karşı ölçülmüştür. *Şekil 4.*' de inorganik fosfat standart eğrisi verilmiştir.



Şekil 4. İnorganik fosfat standart eğrisi.

GABA üretiminin optimizasyonu.

Deney tasarımı.

Çalışmada Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY)' nin tercih edilmesindeki amaç GABA üretiminin optimize edilmesinde ve parametrelerin belirlenmesi sürecinde deney süresini kısaltmak ve test sayısını azaltmaktır. Bu doğrultuda GABA üretim düzeyinin, üretim parametreleri ile ilişkisini veren istatistiksel formülün tespiti amaçlanmıştır. Deney tasarımı ve istatistiksel analizler Design-Expert 12 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında; bağımsız değişkenler olarak MSG konsantrasyonu (mM), pH, sıcaklık (°C) ve NaCl konsantrasyonu (mM), yanıt olarak ise HPLC ile tespit edilen GABA üretimleri (mg/ml) üzerine olan etkilerinin belirlenmesinde Box-Behnken yöntemi kullanılmıştır. Çoklu Regresyon analizlerinde aşağıda yer alan eşitlik 3' de verilen polinomal quadratik model ve regresyon katsayıları kullanılmıştır. Bu eşitlikte “Y” yanıt olarak GABA üretim miktarını, “X” değerleri bağımsız değişkenleri (MSG konsantrasyonu, NaCl konsantrasyonu, sıcaklık ve pH) ifade ederken, β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} değerleri ise regresyon katsayılarını belirtmektedir.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (3)$$

Bağımsız değişkenlerin optimizasyonunda GABA üretim değerinin maksimize edildiği, desirability değerinin 1 olduğu koşullar tercih edilmiştir. GABA üretim sürecinin optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenlerin alt ve üst sınır değerleri Tablo 5.' de verilmiştir. Çalışmada kullanılan deney tasarımı Tablo 6.' da verilmiştir.

Tablo 5. *Bağımsız Değişkenlerin Alt ve Üst Sınır Değerleri*

Bağımsız Değişkenler		pH	MSG konsantrasyonu	Sıcaklık	NaCl konsantrasyonu
Birim			mM	C°	mM
Sembol		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
		Kodlanmış	Gerçek		
Faktör Seviyesi	-1	4	100	25	0
	0	6	200	32,5	2
	1	8	300	40	4

Tablo 6. *Box-Behnken Deney Tasarımı*

Deney No	Bağımsız değişkenler				YANIT
	pH	MSG konsantrasyonu (mM)	Sıcaklık (C°)	NaCl konsantrasyonu (mM)	GABA üretimi (mg/ml)
1	4	100	32.5	2	18.036
2	6	100	32.5	0	14.361
3	8	300	32.5	2	20.862
4	8	100	32.5	2	16.647
5	6	200	25	0	28.180
6	6	300	32.5	4	43.762
7	6	300	32.5	0	34.208
8	6	300	40	2	10.368
9	6	100	40	2	5.511
10	4	200	32.5	4	30.414
11	4	300	32.5	2	38.104
12	6	300	25	2	31.183
13	4	200	40	2	0.022
14	6	200	32.5	2	29.376
15	6	100	25	2	18.482
16	4	200	25	2	32.979
17	8	200	40	2	0.0111
18	8	200	32.5	4	17.603
19	6	200	40	4	10.574
20	8	200	32.5	0	23.525
21	6	100	32.5	4	18.259
22	6	200	25	4	35.805
23	6	200	32.5	2	17.440
24	4	200	32.5	0	24.509
25	8	200	25	2	19.686
26	6	200	32.5	2	29.291
27	6	200	32.5	2	34.313
28	6	200	40	0	6.597

Modelleme sırasında, elde edilen yanıtların değeriendirilmesi ile gidilen optimizasyon işleminde, istenilirlik derecesi (D) hesaplanmıştır. GABA üretiminin maksimize edildiğı, D=1 olduğı koşullarda bağımsız değışkenlerin seviyeleri belirlenmiştir. Emprik veriler analiz edilerek modellenmesi, optimize edilmesi ve 3D grafiklerin sağlanmasında Design-Expert yazılımı (Stat-Ease Inc. Version 12.0 Minneapolis,USA) kullanılmıştır.

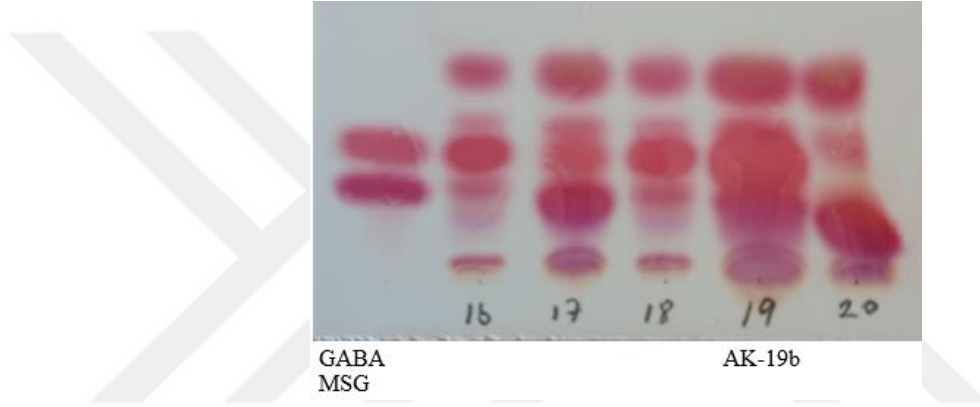


DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

Araştırma Bulguları ve Tartışma

GABA Üretim Yeteneğine Sahip İzolatların Tespiti

Ekşi hamurdan izole edilmiş olan 30 laktik asit bakteri izolatının GABA üretim yetenekleri incelenmiştir. Çalışma kapsamında laktik asit bakteri izolatları 37 °C’ de 96 saat boyunca 53 mM MSG içeren MRS ortamında geliştirilmiştir. GABA üretiminin belirlenmesi için TLC’ de değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen görüntüden (Şekil 5.) hareketle AK19B’ nin yüksek GABA üretim yeteneğine sahip olduğu belirlenmiş ve genotipik olarak tanımlamaya gidilmiştir.

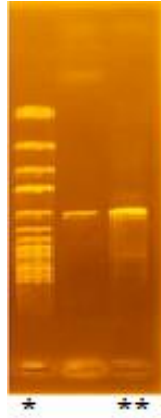


Şekil 5. *L. brevis* AK19B GABA üretimini gösteren TCL görüntüsü.

Moleküler Tanılama

16s rRNA analizi ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

16s rRNA dizi analizi neticesinde AK19B’ nin genotipi belirlenmiştir. PZR ürününün jel elektroforez görüntüsü Şekil 6.’ da verilmiştir.



Şekil 6. PZR ürününün jel elektroforez görüntüsü (*: Leader, **: AK19B).

Laktik Asit Bakterisinin Tanımlanması

Yüksek GABA üretim yeteneğine sahip olan AK19B izolatın genotipik tanımlaması yapılmıştır. *Levilactobacillus brevis* AK19B (Erişim numarası: MZ636922) olarak tanımlanan suş Gram pozitif, katalaz negatif ve kokobasil şekle sahip olduğu belirlenmiştir. Bakteri ileri tanı testleri için %40' lık gliserol içerisinde -80 °C' muhafaza edilmiştir.

Farklı pH Değerinde Gelişme

Ekşi mayalı hamurlarda meydana gelen deamidasyon, asidik ortamda *Lactobacillus reuteri* gibi laktik asit bakterilerinin gelişimine katkı sağlamaktadır (Vermeulen vd., 2007, s. 1199). Bakterinin pH 4, pH 5 ve pH 8 olan MRS sıvı besiyerinde gelişimi Tablo 7.' de verilmiştir. Absorbans sonuçları zayıf, iyi ve çok iyi olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan hareketle *L. brevis* AK19B suşunun pH 5 ve pH 8' de gelişimi çok iyi olarak değerlendirilmiş olup pH 4' de ise gelişimi zayıf kalmıştır.

Tablo 7. *L. brevis* AK19B' nin Farklı pH Değerinde Gelişimi

Gelişim Düzeyleri			
	pH 8	pH 5	pH 4
AK19B	Çok iyi	Çok iyi	Zayıf

Zayıf; Optik yoğunluk değerleri (OD) ≤ 1,0 İyi: OD= 1,1-1,5, Çok İyi: OD ≥ 1,5

Farklı Sıcaklıklarda Gelişim

Bakterinin MRS sıvı besiyerinde 4 °C' de 7 gün, 25 °C' de 2 gün ve 45 °C' de 3 gün süre ile gelişimi Tablo 8.' de verilmiştir. Absorbans sonuçları zayıf, iyi ve çok iyi olarak değerlendirilir. Bakterinin 25 °C' de 2 günlük parametredeki gelişimi çok iyi olarak değerlendirilmiş, diğer sıcaklık parametrelerinde ise gelişimi zayıf kalmıştır.

Bakterilerin üremesi sıcaklık artışı ile paralel olup belli bir sıcaklık derecesine kadar artış göstermektedir. Sıcaklık ile bakteri üremesi arasındaki bu ilişki GABA üretimi içinde benzerlik gösterir. Yapılan bir çalışmada (Li, Qiu, Huang, & Cao, 2010) *L. brevis* NCL912' nin GABA üretiminin 30 °C ve 35 °C' de maksimum seviyeye ulaştığını 45 °C' de ise bakteri gelişimi ve GABA üretiminin gözlemlenmediği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç çalışmadan elde edilen sonuç ile paralellik göstermektedir. Yüksek sıcaklık, *L. brevis* AK19B' nin üremesini olumsuz etkilediği belirlenmiştir ve yüksek sıcaklıkta GABA üretimi üzerine yapılan çalışmaları negatif yönde etkileyeceği düşünülmektedir.

Tablo 8. *L. brevis* AK19B' nin Farklı Sıcaklıklarda Gelişimi

	Gelişim Düzeyleri		
	4 °C'de 7 gün	25 °C'de 2 gün	45 °C'de 3 gün
AK19B	-	Çok iyi	Zayıf

Zayıf; Optik yoğunluk değerleri (OD) $\leq 1,0$ İyi: OD= 1,1-1,5, Çok İyi: OD $\geq 1,5$

Termotolerant Kapasite

Fermantasyon sonrası ısıtıl işlem gören ürünlerde, kullanılan suşların ısıtıl işleme dayanıklılığı önem arz eder (Çinar Topçu, 2019). Öyle ki laktik asit bakterilerinin ısıtıl işlem sonrası canlı kalabilmeleri, pişirilen ürünlerin raf ömrünü uzatabileceği (Victoria-León, Totosaus, Guerrero, & Pérez-Chabela, 2006) gibi termotolerant laktik asit bakterilerinin mikrobiyal açıdan güvenliğin sağlanmasında biyokoruyucu kültür olarak kullanılabileceğinin bir göstergesi olabilir (Pérez-Chabela, Lara-Labastida, Rodriguez-Huezo, & Totosaus, 2013).

Yüksek sıcaklık bakteri üremesini olumsuz etkilediğinden (bakteri türleri arasında farklılık göstermekle birlikte) 70 °C gibi aşırı yüksek sıcaklıklarda mezofil bakteriler gelişim sergileyemezler. *L. brevis* AK19B' nin 45 °C' de zayıf bir gelişim göstermesi bakterinin 70 °C gibi bir sıcaklıkta gelişim gösteremeyeceği hakkında fikir vermektedir. Yapılan analiz neticesinde bakterinin yüksek sıcaklıklarda (70 °C) gelişim yeteneğinin olmadığı yani termotolerant özelliğe sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

Yüksek Tuz Konsantrasyonunda Gelişme

Bakterinin izole edildiği kaynağın tuz içeriği, bakterinin yüksek tuz içeren ortamda gelişimi üzerine fikir verebilir. *L. brevis* AK19B suşunun %7, %10 ve %15 NaCl içeren MRS sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan hareketle bakterinin %7 NaCl içeren ortamdaki gelişiminin %10 NaCl ve %15 NaCl içeren ortamdaki gelişimine kıyasla iyi bir gelişme gösterdiği söylenebilir. Analiz sonuçlarından hareketle yüksek konsantrasyonlarda tuz içeren ortamların *L. brevis* AK19B' in gelişimi (Tablo 9.) üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

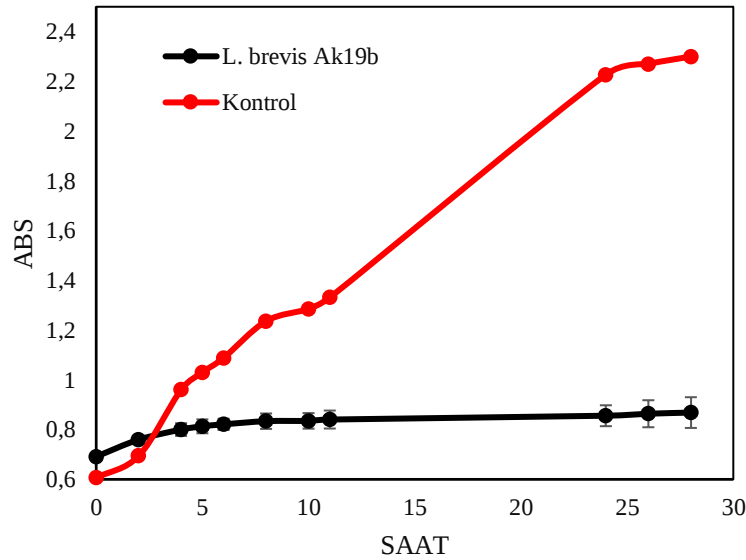
Tablo 9. *L. brevis* AK19B' nin Yüksek Tuz Konsantrasyonunda Gelişimi

	Gelişim Düzeyleri		
	%7 NaCl	%10 NaCl	%15 NaCl
AK19B	Zayıf	Çok iyi	-

Zayıf; Optik yoğunluk değerleri (OD) $\leq 1,0$ İyi: OD= 1,1-1,5, Çok İyi: OD $\geq 1,5$

Safra Tuzuna Direnç

Safra suyu karaciğerde sentezlenir, safra kesesinde depolanır ve vücut ihtiyaç duyduğunda yağları emülsifiye etmesi ve çözmesi için ince bağırsağa salgılanır (Begley, Hill, & Gahan, 2006; Mathara vd., 2008). Safra asitlerinin konjugasyonu sonucunda safra tuzları oluşur. Kolesterolün karaciğerden atılımının sağlanması gibi önemli bir etkiye sahiptir. Safra asitleri ayrıca sindirim enzimlerinin optimum seviyede çalışmasını sağlar (Önür, & Beyler, 2001). Bahsedilen bu etkilerin görülebilmesi için, probiyotik bakteriler gastrointestinal sistemden geçebilmeli, asidik ortamlarda (pH 2,5-3,5) ve sindirim sisteminin %0,3 safra tuzu içeren koşullarında canlılıklarını devam ettirmelidir (Jang, Lee, & Paik, 2019; Saarela, Mogensen, Fonden, Mättö, & Mattila-Sandholm, 2000). %0,3 safra tuzu içeren ve pH' sı 4 olan MRS sıvı besiyerinde gelişen *L. brevis* AK19B, Şekil 7.' den de görüleceği üzere gelişimini belirli bir seviyeye kadar sürdürmüş ardından gelişimi yavaşlamış ve bakteri safra tuzuna direnç gösteremeyip gelişimini durdurmuştur. *Lactobacillus* kültürleri ile yapılan çalışmalarda %0,3 safra tuzu konsantrasyonunda kültürlerin gelişiminin yavaşladığı belirlenmiştir (Maragkoudakis vd., 2006; Pennacchia vd., 2004).

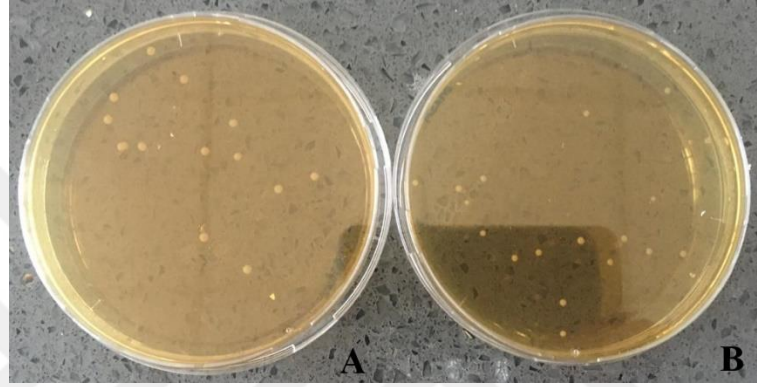


Şekil 7. Safra tuzları varlığında *L. brevis* AK19B'nin ortamdaki varlığı.

Mide Ortamına Direnç

Probiyotik karakterli suşların seçiminde asit toleransı, suşun canlılığının ve işlevselliğinin garanti edilebilmesi için başlıca dikkat edilen bir özelliktir. Bu sebeple gastrointestinal sistemin simüle edildiği çeşitli modeller geliştirilmiş ve pH' nın 1,5–3 olduğu enzimatik ortamlarda 1-4 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir (Fontana, Bermudez-Brito, Plaza-Diaz, Muñoz-Quezada, & Gil, 2013). *L. brevis* AK19B suşunun düşük pH ve enzimatik

ortamdaki toleransı belirlenmiştir. pH 2,5’ da ve 3 mg/mL pepsin içeren enzimatik ortamda 2 saatlik inkübasyon sonucunda canlı sayısını (2×10^3 kob/mL) (inkübasyon öncesi canlı hücre sayısı $1,8 \times 10^9$ kob/mL) koruduğu belirlenmiştir. Yapılan birçok çalışmada laktik asit bakterilerinin ve probiyotik özellikteki bifidobakterlerin asit toleransa sahip olduğu ve bağırsaklarda tutunabilir özellikte olduğu belirlenmiştir (Conway, Gorbach, & Goldin, 1987; Goldin vd., 1992; Q. Li, Chen, Ruan, Zhu, & He, 2010). Bu sonuç literatürdeki diğer çalışmalar (Jang vd., 2019; Son vd., 2017) ile uyum içerisinde olup *L. brevis* AK19B’ nin mide ortamında hücre duvarına yapışma özelliğinin olduğunu ve canlı kalabildiğini göstermektedir. Ayrıca probiyotik karakterde olduğu da bu sonuçlardan hareketle söylenebilir.



Şekil 8. *L. brevis* AK19B’ nin mide ortamına dayanıklılığı (A: İnkübasyon öncesi 10^{-7} seyreltme, B: Yıkama sonrası (inkübasyon öncesi) 10^{-1} seyreltme)

Hücre Yüzey Hidrofobisitesi

Hidrokarbonlara tutunma özelliğinin belirlenmesinde kullanılan yöntem mikroorganizmaların hidrofob özelliklerini belirlemektedir. Bu özellik immün sistemi modüle etmesi, zarar görmüş mukozanın iyileşmesini artırması ve patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu azalttığı için büyük öneme sahiptir. Probiyotik bakterilerin bağırsakta kolonizasyonunda etkili olan özelliklerden biri olan hidrofobisite, mikroorganizmanın yüzey özelliklerinden etkilenmektedir. Bağırsak yüzeyine tutunmalarında etkili olan hidrofobik bileşenler adhezin veya polisakkarit, teikoik asit ve yağ asitleri gibi yapılardır. Bağırsak epitelinde bulunan glikoprotein ve glikolipidlerin karbonhidrat uzantıları ile mikroorganizmaların yüzeylerinde bulunan hidrofobik yapılar arasında kovalent etkileşim meydana gelmektedir (Grajek, Sip, Foksowicz-Flaczyk, Dobrowolska, & Wita, 2016, s. 311). Bakterinin gelişme ortamı, düşük pH, bakteri hücresinde bulunan karbonhidratlar ve bakteriyel hücrelerin proteaz ile muamelesi gibi birçok faktör bakterinin tutunma özelliğini etkilemektedir (Önal, Beyatlı, & Aslım, 2005).

Bu çalışmada bakteri hücre yüzey hidrofobisitesi (%) eşitlik 1' deki formülünden hareketle $9,87 \pm 2,65$ olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki çalışmalar ile kıyaslandığında (Jang vd., 2019; Jang, Song, Lee, & Paik, 2018) *L. brevis* AK19B' nin tutunma özelliğinin daha yüksek olduğu görülse de Kariyawasam, Yang, Lee, & Paik, (2020) *L. brevis* KU200019 izolatının %50' nin üzerinde hidrofobisite gösterdiğini bildirmişlerdir. %20'nin altında hidrofobisite sergileyen mikroorganizmalar hidrofilik olarak değerlendirilebilir (Grajek vd., 2016).

Antimikrobiyal Etki Spektrumu

Yapılan analiz sonucunda *L. brevis* AK19B' nin patojen mikroorganizmaların gelişimini baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Tablo 10.' da gösterildiği üzere AK19B *E. coli* BC 1402, *B. cereus* BC 6830, *Y. enterocolitica* ATCC 27729 ve *S. typhimurium* RSSK 95091' a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Jang vd., (2019) *L. brevis* KU15153 izolatının *E. coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *S. Typhimurium* P99 ve *Staphylococcus aureus* KCCM 11335'e karşı belirgin antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bu antimikrobiyal aktiviteler asetik asit, laktik asit, diasetil ve bakteriyosin gibi metabolitlerin üretiminden kaynaklanmaktadır (Jang vd., 2019; Oliveira vd., 2017; Šušković vd., 2010).

Tablo 10. *L. brevis* AK19B' nin Antimikrobiyal Etki Düzeyleri

İnhibisyon Düzeyleri				
	P12	P60	P78	P91
AK19B	+++	++	+++	+++

*(P12: *E. coli* BC 1402, P60: *B. cereus* BC 6830, P78: *S. typhimurium* RSSK 95091, P91: *Y. enterocolitica* ATCC 27729, P94: *S. aureus* ATCC 25923)

*(-): İnhibisyon yok; (+): 10-14 mm; (++) : 14-18 mm; (+++): >18 mm

Antifungal Aktivite

L. brevis AK19B' nin küfler üzerine spor oluşumunu engelleyici etki gösterirken belirli düzeyde hem spor oluşumunu hem de miselyal gelişimi inhibe etmişlerdir. Laktik asit bakterilerinin antifungal etkileri organik asit, reuterin, fenil laktik asit, döngüsel peptitler, yağ asitleri ve proteinli maddeler gibi birçok bileşenden kaynaklanabilmektedir (Crowley, Mahony, & van Sinderen, 2013). *L. brevis* AK19B' nin antifungal etkiye (Tablo 11. ve Şekil 9.) sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 11. *L. brevis* AK19B' nin Antifungal Etki Düzeyleri

	İnhibisyon Düzeyleri	
	Aspergillus	Penicillium
AK19B	+	+

* A: *Aspergillus niger*, P: *Penicillium chrysogenum*.

*(-): İnhibisyon yok; (+): 10-14 mm; (++) : 14-18 mm; (+++): >18 mm



Şekil 9. *L. brevis* AK19B' nin antifungal aktivitesi.

Antibiyotik Dirençliliği

Bakteriler antibiyotiklerin etkinliğini durduran veya etkinliklerini azaltan etkiye sahiptir (Read, & Woods, 2014). Günümüzde küresel bir sorun haline gelen antibiyotik direnci, bakterilerin dirençli olmasına ve patojen bakteriler üzerindeki etkilerinin azalmasına sebep olmaktadır (Babakhani, & Oloomi, 2018). Bu çalışmada *L. brevis* AK19B' nin vankomisin, streptomisin, ampisilin, eritromisin, tetrasisin, penisilin G, kanamisin, oksasilin, gentamisin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı direnç özelliği belirlenmiş ve Tablo 12.' de verilmiştir. Analiz neticesinde *L. brevis* AK19B' nin streptomisin, ampisilin, eritromisin, tetrasisin, penisilin G, kanamisin ve kloramfenikole karşı direnç göstermediği tespit edilmiştir. *L. brevis* AK19B' nin vankomisin, gentamisin ve oksasilin antibiyotiklerine karşı direnci, bağırsak ortamındaki patojen bakterileri antibiyotik tedavisine dirençli hale getirebilir. Bu durum LAB' lerinin antibiyotik direncinin neden olduğu olumsuz ve tercih edilmeyen bir sonuçtur (Falah, Vasiee, Alizadeh Behbahani, Tabatabaee Yazdi, & Mortazavi, 2021).

Tablo 12. *L. brevis* AK19B Suşuna Ait Antibiyotik Direnç Testi Verileri

Antibiyotik Grubu	Zon Çapı (mm)
Vankomisin (VA 30 µg)	-
Streptomisin (S 10 µg)	2±0
Ampisilin (AMP 10 µg)	14±0
Eritromisin (E 15 µg)	18±2.12
Kloramfenikol (C 30 µg)	16±1.41
Gentamisin (CN 10 µg)	-
Oksasilin (OX 1 µg)	-
Kanamisin (K 30 µg)	2±0
Penisilin G (P 10 µg)	15±2.12
Tetrasisin (TE 30 µg)	3±0

Antioksidan Aktivite

Laktik asit bakterilerinin ekşi hamurdaki metabolizması ile fermantasyon boyunca lipit oksidasyonu ve güçlü bir antioksidatif etki oluşturabilirler (Ertop, & Hayta, 2016). LAB suşlarının antioksidan aktiviteleri serbest radikallerden korunmada önemli bir rol almaktadır (Jang vd., 2019). Bazı laktobasil türlerinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve vücutta reaktif oksijen türlerinin birikimi riskini azaltabileceği bilinmektedir (Kaizu, Sasaki, Nakajima, & Suzuki, 1993). *L. brevis* LAP2' nin radikal süpürme aktivitesi konsantrasyona bağlı olarak arttığını (108-109 kob mL⁻¹ de %18,8-68,68) (Aarti vd., 2017), *L. brevis* LSe' nin %0 ve %9,3 değerleriyle çok düşük bir radikal süpürme aktivitesine sahip olduğu belirlemiştir (Shakibaie vd., 2017). Antioksidan aktivitenin farklılık göstermesi bakterinin metabolit üretimi, enzim, bakterini hücre duvarı bileşimi gibi çeşitli özelliklere bağlı olarak ve suşa özgü olarak değişiklik göstermektedir (Jang vd., 2019).

L. brevis AK19B' nin antioksidan aktivitesi (Tablo 13.), %65,06±0,85 olarak hesaplanmıştır. Alizadeh Behnahani vd., (2020) *L. brevis* A3 izolatının antioksidan aktivitesini %59,67±0,79 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmada kullanılan *L. brevis* A3 izolatının antioksidan aktivitesi ile kıyaslandığında *L. brevis* AK19B' nin daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 13. *Antioksidan aktivite*

	% İnhibisyon
AK19B	65,06±0,85

Fitaz Enzimi Aktivitesi

Fitik asit (miyo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrojen fosfat), tahıl tanelerinin ve yağlı tohum posalarının yaklaşık olarak %1-4' ünü oluşturmaktadır. Miyo-inositol ve fosfor kaynağı olmasına rağmen yapısının oldukça yüklü olması şelatlayıcı özelliği ve aminoasitleri kompleks haline getirmesi sebebiyle beslenme açısından olumsuzluklar yaratmaktadır (De Angelis vd., 2003). Serbest myo-inositol, myo-inositol fosfat ve inorganik monofosfata hidrolize eden enzim fitaz (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) enzimidir (Kerovuo, 2000). Fitaz aktivitesi tahıl bazlı ürünlerde besin kalitesini etkilemektedir. Ekşi mayalı ürünlerden elde edilen laktik asit bakterileri fitik asidi bozan bir asitleşmeyi teşvik eder ve ekmek gibi fermente edilmiş gıdalarda mineral seviyesinin yüksek olmasını sağlayabilir (De Angelis vd., 2003). Laktik asit bakterilerinin fitaz enzimi aktivitesi türler arası farklılık göstermektedir.

L. brevis AK19B' nin 700 nm' deki absorbansı 0,790 olarak ölçülmüştür. Doğrunun denkleminde ve fitaz aktivitesi formülünden hareketle *L. brevis* AK19B' nin enzim aktivitesi 5,31±0,17 mU/mL olarak hesaplanmıştır. Zamudio, Gonzalez ve Medina, (2001), yapmış oldukları çalışmada *L. plantarum* izolatının ekstraselüler enzim aktivitesini 6,5 mU/ml olarak ifade ederken benzer şekilde, Raghavendra ve Halami, (2009) tarafından *Pediococcus pentosaceus* CFR izolatı için 37 °C' 4,4 mU / ml olarak bildirilmiştir. *L. brevis* AK19B suşunun göstermiş olduğu hücre dışı enzim aktivitesi, izolatın starter kültür olarak kullanım imkanlarını olumlu yönde etkileyebileceği söylenebilir. Hücre içi enzim aktivitesine kıyasla hücre içi enzim varlığı, mikroorganizmanın fermentasyon sırasında ürüne fonksiyonel olarak katkıda bulunabileceği anlamına gelmektedir (Mohammadi-Kouchesfahani, Hamidi-Esfahani, & Azizi, 2019).

Deney Tasarımı

GABA üretiminin optimizasyonunda Tablo 6.' da verilen Box-Behnken deney matrisi ile sağlanan yanıtlar kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Modelleme aşamasında bazı modellere ait yanıt yüzey metodu istatistik ve ANOVA sonuçları Tablo 14. ve Tablo 15.' de verilmiştir.

Tablo 14. *GABA Üretim Miktarına Ait RSM Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi*

Model	Standart sapma	p-değeri	R ²	R ² düzeltilmiş	R ² tahminlenen	LOF F değeri	LOF p-değeri	press	
Lineer	7,32	<0,0001	0,6552	0,5952	0,4983	1,05	0,5671	1791,39	
2FI	7,91	0,8354	0,7024	0,5274	0,1909	1,26	0,4821	2888,84	
Quadratic*	5,19	0,0039	0,9020	0,7965	0,6076	0,3802	0,8923	1400,99	suggested
Cubic	5,78	0,6998	0,9532	0,7471	0,4022	0,1256	0,8864	2134,53	aliased
Kaynak	Tahmini katsayı		Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare	F değeri	P değeri		
Model	27,61		3220,491	14	230,3	8,55	0,0002	Önemli	
X ₁ (pH)	-3,81		174,27	1	174,27	6,47	0,0244		
X ₂ (MSG konsantrasyonu)	7,27		633,55	1	633,55	23,54	0,0003		
X ₃ (Sıcaklık)	-11,1		1479,21	1	1479,21	54,96	<0,0001		
X ₄ (NaCl konsantrasyonu)	2,09		52,24	1	52,24	1,94	0,1870		
X ₁ *X ₂	-3,96		62,83	1	62,83	2,33	0,1505		
X ₁ *X ₃	3,32		44,10	1	44,10	1,64	0,2229		
X ₁ *X ₄	-2,96		34,977	1	34,97	1,30	0,2749		

Tablo 15. *GABA Üretim Miktarına Ait RSM Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi (Tablo 14. devamı)*

Kaynak	Tahmini katsayı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare	F değeri	P değeri	
$X_2 * X_3$	-1,96	15,38	1	15,38	0,5715	0,4631	
$X_2 * X_4$	1,41	8	1	8	0,2971	0,5949	
$X_3 * X_4$	-0,9119	3,33	1	3,33	0,1236	0,7308	
X_1^2	-4,32	112,13	1	112,13	4,17	0,0621	
X_2^2	-0,9002	4,86	1	4,86	0,1806	0,6778	
X_3^2	-9,7	564,33	1	564,33	20,97	0,0005	
X_4^2	1,35	10,96	1	10,96	0,4073	0,5344	
Kalan		349,92	13	26,92			
Uyum Eksikliği		195,60	10	19,56	0,3802	0,8923	Önemsiz
Hata		154,32	3	51,44			

Tablo 6.' da verilen GABA üretiminin belirlendiği test koşulları için belirlenen deneysel tasarım matrisi yer almaktadır. Deney tasarım matrisinde kullanılan koşullar pH için 4-8, inkübasyon sıcaklığı 25-40 °C, MSG konsantrasyonu 100-300 mM ve NaCl konsantrasyonu için 0-4 mM aralığında değişmektedir. Farklı denemeler ile bağımsız değişkenlerin GABA üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Deneme 6' da pH' nin 6, MSG konsantrasyonunun 300 mM, sıcaklığın 32,5 ve NaCl içeriğinin 4 mM olduğu koşulda GABA üretimi (43,762 mg/mL) en yüksek düzeyde tespit edilirken, en düşük GABA üretimi, deneme 17' de pH 8, 200 mM MSG ve 2 mM NaCl içeren, inkübasyon sıcaklığının ise 40 °C olduğu koşullarda 0,0110 mg GABA / mL konsantrasyonda GABA üretimi tespit edilmiştir.

Tablo 14. ve Tablo 15.' de yer alan ANOVA ve RSM model istatistikleri değerlendirildiğinde, quadratik modelin, lineer, 2FI ve kübik modellere kıyasla en iyi tahminleme düzeyine sahip olduğu görülmektedir. Fakat Design-Expert yazılımının GABA üretim yanıtı için değerlendirdiği kübik modele ait determinasyon katsayısı, quadratik modele kıyasla daha yüksek (0,9532) olmasının yanında p değerinin 0,6998 olması bu modeli önemsiz kılmıştır. Quadratik model yüksek determinasyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş determinasyon katsayısı (R^2_{adj}) ve tahmini determinasyon katsayısı (R^2_{pre}) na sahip olduğu gibi sağladığı p-değeri diğer modellerden oldukça düşüktür. Bu nedenle quadratik model kullanılarak GABA üretimi için elde edilen denklem eşitlik 4' de verilmiştir.

$$Y(\text{GABA konsantrasyonu}) = 27,61 - 3,81X_1 + 7,27X_2 - 11,10X_3 + 2,09X_4 - 3,96X_1 * X_2 + 3,32X_1 * X_3 - 2,96X_1 * X_4 - 1,96X_2 * X_3 + 1,41X_2 * X_4 - 0,9119X_3 * X_4 - 4,32X_1^2 - 0,9002X_2^2 - 9,70X_3^2 + 1,35X_4^2 \quad (4)$$

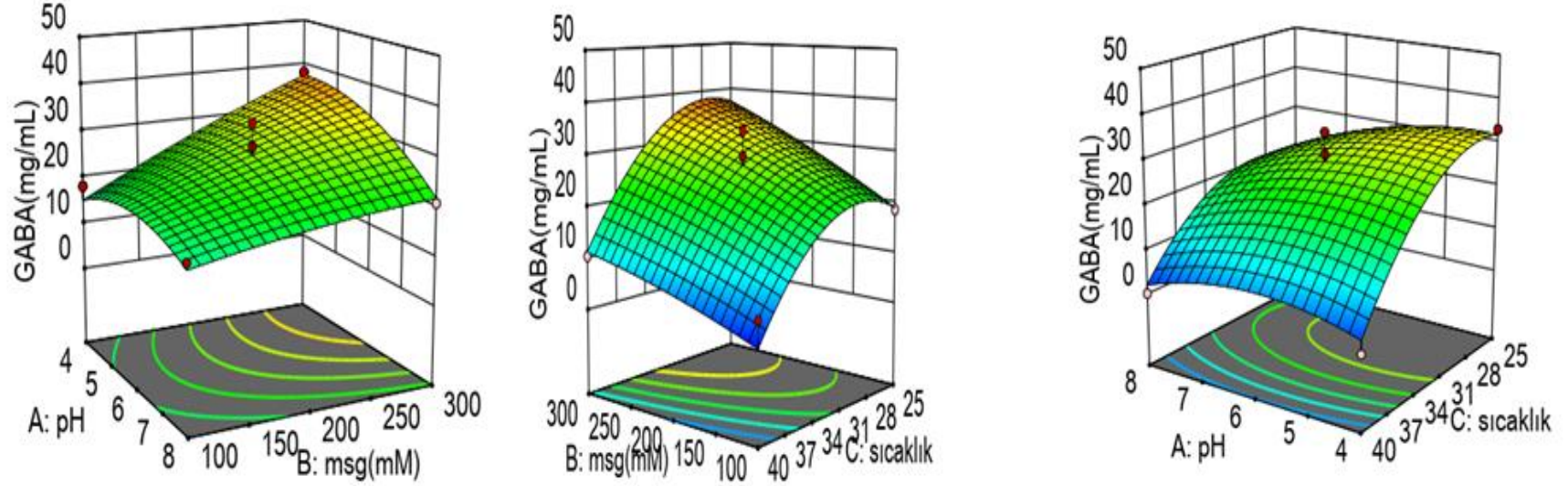
Laktik asit bakterileri ile GABA üretiminin optimizasyonunda quadratik modelin tercih edildiği çalışmalar oldukça yaygındır (Tajabadi, Baradaran, vd., 2015; Tajabadi, Ebrahimpour, vd., 2015; Zareian, Ebrahimpour, Mohamed, & Saari, 2013). Model değerlendirildiğinde Tablo 14. ve Tablo 15.' de verilen ANOVA değerleri, modelin ($p < 0,001$) önemli olduğunu gösterirken, uyum eksikliği (lack of fit) ($p = 0,8923$) önemsiz olarak belirlenmiştir. Tablo 14. ve Tablo 15.' de de görüldüğü gibi, lineer parametrelerden X_1 , X_2 , X_3 , quadratik terimlerden X_3^2 önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.

Şekil 10.' da verilen 3 boyutlu ve kontur grafikleri, bağımsız değişkenlerin etkilerini göstermektedir. Sıcaklığın GABA üretimi üzerine etkisi irdelendiğinde, düşük sıcaklık ve pH' da GABA üretiminin arttığı görülmektedir. Düşük pH' da sıcaklığın yüksek olduğu ve MSG konsantrasyonun düşük olduğu durumlarda GABA üretiminin de düştüğü görülürken, MSG ve NaCl konsantrasyonunun etkisi değişkenlik göstermektedir.

L. brevis’ de tanımlanan GABA üretiminde etkili olan gadC geninin pH 5,6’ nın üzerinde daha aktif olduğu bilinmektedir (Yu vd., 2012). *L. brevis* AK19B’ de bu genin 96 saat inkübasyon süresince bakteri tarafından üretilen laktik asit gibi organik asitlerin ortam pH’ sını 5,6’ nın altında bir asitliğe düşürdüğü buna bağlı olarak da GABA üretiminin düştüğü yorumu yapılabilir. Cataldo, Villegas, Savoy de Giori, Saavedra ve Hebert, (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.

L. brevis AK19B suşu ile GABA üretiminde NaCl konsantrasyonunun değişkenlik göstermesi bakterinin izole edildiği kaynağın tuz içeriği ile ilgili olabilir. Binh vd., (2014) çalışmalarında *L. brevis* K203 suşunun %0-7 NaCl içeren ortamda geliştiğini ve %1 NaCl içeriğindeki ortamda en iyi GABA üretimi (42 mg/mL) sağlamışlardır. Li, Qui, Gao, vd., (2010) *L. brevis* NCL 912 ile GABA üretimi gerçekleştirdikleri çalışmalarında, kültür ortamına CaCl₂ (1 g/L) ilavesinin GABA üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada da olduğu gibi bakterilerin gelişimi ile sıcaklık arasındaki ilişki GABA üretimini de etkilemektedir. Cataldo vd., (2020) kültür koşullarının *L. brevis* CRL 2013 GABA üretimi üzerine etkilerini incelediği çalışmalarında 20-45 °C arasında değişen sıcaklıklarda en yüksek GABA (265 mM) veriminin 30 °C ve 37 °C’ de elde edildiğini tespit etmişlerdir. Sıcaklığın yükselmesiyle GABA üretiminin önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Li, Qui, Huang ve Cao, (2010) *L. brevis* NCL912 ile yaptıkları çalışmada 45 °C’ de bakteri gelişimi ve GABA üretimi görülmediğini, sıcaklığın düşmesi ile birlikte yüksek verimde GABA üretiminin 30 °C’ ve 35 °C’ de elde edildiğini tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlardan hareketle maksimum verimde GABA üretimi üzerine yüksek hücre yoğunluğunun yanında uygun sıcaklık değerlerinin de etkili olduğu gösterilmiştir.

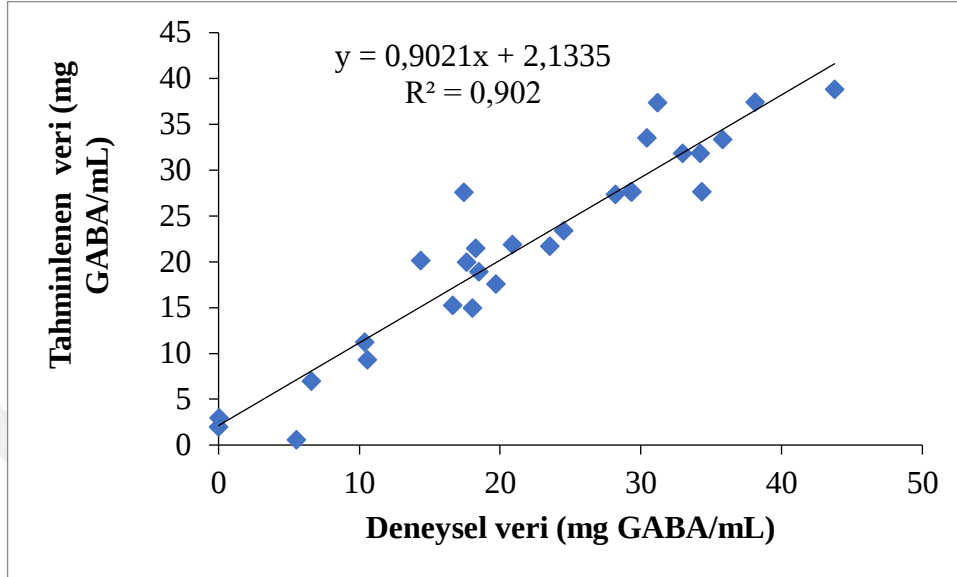


Şekil 10. Sıcaklık, pH, NaCl ve MSG konsantrasyonunun GABA üretimi üzerine etkisi A: MSG* pH verilerine ait üç boyutlu interaksiyon grafiği (sıcaklık=32,5°C NaCl=2mM) B: sıcaklık*MSG verilerine ait üç boyutlu interaksiyon grafiği (pH=6, NaCl=2mM) C: pH*sıcaklık verilerine ait üç boyutlu interaksiyon grafiği (MSG=300mM, NaCl=2mM).

Bağımsız değişkenlerin optimizasyonunda istenilirlik değeri dikkate alınmıştır. Bu amaçla Design-Expert programı tarafından D=1 değerine sahip pH 4,01-5,73, MSG konsantrasyonu 231,43-299,96 mM, sıcaklık 25,01-30,82 °C ve NaCl konsantrasyonu 1,89-4 mM arasında değişen 100 çözüm sunulmuştur.

Modelin Doğrulanması

L. brevis AK19B suşu ile GABA üretim koşullarının optimizasyonundan elde edilen model kullanılarak, üretim sonrası sağlanan verilerin uyumluluğu Şekil 11.' de yer alan grafikte gösterilmektedir. Deneysel veriler ile tahmini verilere ait modelin R^2 değeri 1'e yakındır.



Şekil 11. *L. brevis* AK19B suşunun GABA üretimin optimizasyon çalışması ile elde edilen modelin deneysel veriler ile uyumluluğu.

Optimum Noktanın Belirlenmesi ve Geçerliliği

Yapılan bu optimizasyon çalışmasında, önerilen GABA üretimini maksimize etmek amacıyla $D=1$ değerine sahip, pH 5,14, MSG konsantrasyonunun 297 mM, sıcaklığın 26 °C ve NaCl konsantrasyonun 2,82 mM olduğu optimum üretim koşullarında GABA üretimi 43,85 mg / mL olarak tahminlenmiştir. Optimum koşullarda yapılan üretim sonucunda 31,6 mg / mL GABA üretimi sağlanmıştır. Elde edilen bu sonuç deneysel ve tahmin edilen değerlerin uyum içinde olduğunu göstermektedir.

BEŞİNCİ BÖLÜM

Sonuçlar

Bu tez çalışması kapsamında ekşi mayalı hamurdan izole edilen AK19B izolatu moleküler olarak tanımlanmış ve tekno-fonksiyonel özellikleri belirlenmiştir. Yapılan analizler neticesinde AK19B' den GABA üretimi için ortam koşulları (MSG konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve NaCl konsantrasyonu) optimize edilerek yüksek verimde GABA eldesi amaçlanmıştır. Araştırmadan elde edilen sonuçlardan hareketle aşağıdaki sonuç ve önerilere varılmıştır.

1. AK19B olarak isimlendirilen izolatu 16s rRNA dizi analizi ile *L. brevis* AK19B (Erişim numarası: MZ636922) olarak doğrulanmıştır. *L. brevis* AK19B suşunun spot kültür yöntemi ile 4indikatör suşa karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Suşun *Escherichia coli* BC 1402, *B. cereus* BC 6830, *Salmonella typhimurium* RSSK 95091 ve *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729' a karşı iyi bir antagonistik aktivite gösterdiği belirlenmiş olup bu sonuç suşun koruyucu bir kültür olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Belirlenen bu antimikrobiyal etkinin bakterinin laktik asit gibi metabolit üretiminden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.
2. *L. brevis* AK19B suşunun küfler üzerine spor oluşumunu ve belirli düzeyde miselyal gelişimi inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu durumun ise laktik asit, döngüsel peptitler, yağ asitleri ve proteinli maddeler gibi birçok bileşen kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu durum antibakteriyal aktivitede olduğu gibi suşun koruyucu kültür özelliğini ortaya koymaktadır.
3. *L. brevis* AK19B suşunun yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir ve suşun gıdalarla vücuda alımı neticesinde serbest radikal birikimini azaltabileceği düşünülmektedir.
4. *L. brevis* AK19B suşunun 25 °C' de gelişiminin çok iyi bir çoğalma gösterirken 45 °C ve 4 °C' de ise gelişimi zayıf bir çoğalma göstermiştir. Bu sonuç sıcaklık artışının bakteri gelişimini negatif yönde etkilediğini ortaya koymaktadır.
5. *L. brevis* AK19B' nin yüksek sıcaklıklarda (70 °C) gelişim yeteneğinin olmadığı yani termotolerant özelliğe sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

6. pH' nın 4, 5 ve 8 olarak ayarlandığı sistemde belirlenen pH değerlerinin *L. brevis* AK19B' nin gelişimi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bakteri, pH' sı 5 ve pH' sı 8 olan ortamda çok iyi bir gelişme göstermiştir. Fakat pH' nın 4 olarak ayarlandığı ortamda bu gelişim asitliğin etkisiyle zayıf kalmıştır. Bu durum bakterinin hücre yapısı ile ilgili olabilir. Elde edilen sonuçlardan hareketle asitliğin artması ile bakteri gelişiminin baskılandığı sonucuna varılabilir.
7. %7, 10 ve 15 NaCl içeren ortamda geliştirilen AK19B suşunun %7 NaCl içeren ortamdaki gelişiminin %10 NaCl ve %15 NaCl içeren ortamdaki gelişimine kıyasla daha iyi bir gelişme olduğunun ancak bu gelişimin ise bakterinin yüksek tuz içeriğine sahip ortamlarda kısıtlandığını göstermektedir.
8. Düşük pH değerindeki ortamlarda bakteriler safra tuzuna direnç gösteremezler ve pH' nın da etkisiyle gelişimleri baskılanır. Yapılan analizde *L. brevis* AK19B %0,3 safra tuzu içeren ve pH' sı 4 olan ortamda safra tuzuna karşı direnç gösterememiş, gelişimi yavaşlamış ardından durmuştur.
9. *L. brevis* AK19B suşunun mide ortamına direnci belirlenmiştir. Bakteri mide ortamında 3 logaritmik birim canlı kalmıştır, 6 logaritmik birim inhibisyon gerçekleştirmiştir. Bu sonuç bakterinin enzimatik ve asidik ortama dayanıklılığının olduğunu, canlı kalabildiğini göstermektedir. Varılan bu kanının *L. brevis* AK19B bakterisinin probiyotik karaktere sahip olduğunun ayrıca göstergesi sayılabilir.
10. Özellikle probiyotik karakterli bakterilerin sahip olduğu hücre yüzey hidrofobisitesi bakterilerin gelişme ortamı, düşük pH vb. birçok faktörden etkilenmektedir. Bakteri türleri arasında farklılık gösteren bu özellik yapılan analiz neticesinde *L. brevis* AK19B bakterisinde $9,87 \pm 2,65$ olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç bakterinin tutunma özelliğinin zayıf olduğunu literatürdeki diğer bazı bakterilere (*L. brevis* KU15153) (Jang vd., 2019) kıyasla ise yüksek olduğunu göstermektedir. Bakteri hidrofil olarak değerlendirilebilir.
11. *L. brevis* AK19B' nin fitaz enzimi aktivitesi $5,31 \pm 0,17$ mU/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer fitaz enzim aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.
12. *L. brevis* AK19B olarak tanımlanan laktik asit bakterisinin streptomisin, ampicilin, eritromisin, tetrasisin, penisilin G, kanamisin ve kloramfenikole karşı direnç

göstermemektedir. *L. brevis* AK19B' nin vankomisin, gentamisin ve oksasilin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

13. GABA üretiminin optimize edilmesi amacıyla optimizasyon çalışmasında kullanılacak üretim parametreleri belirlenmiş ve bu doğrultuda üretim gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan üretim parametrelerinden sıcaklığın GABA üretimi üzerine etkisi irdelendiğinde düşük sıcaklık ve düşük pH değerlerinde GABA üretimi artmıştır. Sıcaklığın yüksek, MSG konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda GABA üretiminin de düştüğü görülmektedir. MSG ve NaCl konsantrasyonunun üretim üzerindeki etkisi ise değişkenlik göstermiştir. Çalışmada optimum koşullarda yapılan 4 tekrarlı üretim sonucunda *L. brevis* AK19B ile 31,06 mg / mL GABA üretimi sağlanmıştır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma da *L. brevis* AK19B' nin tekno-fonksiyonel özellikleri belirlenmiş ve GABA üretimi optimizasyonu bakteriye uygun koşullarda yapılmış ve bu koşullarda yüksek verimde üretim gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçların literatüre ve endüstriyel ölçekteki diğer çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Kaynakça

- Aarti, C., Khusro, A., Varghese, R., Arasu, M. V., Agastian, P., Al-Dhabi, N. A., Choi, K. C. (2017). In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. *LWT*, 86, 438-446. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.055>
- Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Falah, F., & Vasiee, A. (2020). Gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and antimicrobial activity. *Food Science & Nutrition*, 8(10), 5330-5339. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1838>
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 58(11), 905-917.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Binh, T. T. T., Ju, W.-T., Jung, W.-J., & Park, R.-D. (2014). Optimization of γ -amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 36(1), 93-98. doi: 10.1007/s10529-013-1326-z
- Bown, A. W., & Shelp, B. J. (1997). The metabolism and functions of [gamma]-aminobutyric acid. *Plant Physiology*, 115(1), 1.
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 16050-16055.
- 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>
- Cho, Y. R., Chang, J. Y., & Chang, H. C. (2007). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 104-109.
- Choi, Y. M., Suh, H. J., & Kim, J. M. (2001). Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry*, 20(4), 287-292.
- Çınar Topçu, K. (2019). *Pastırmadan izole edilen ve tanımlanan laktik asit bakteri suşlarının probiyotik ve teknolojik özellikleri*. (Doktora Tezi) Yüksek Öğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez no: 561939).
- 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.010>

- Conway, P., Gorbach, S., & Goldin, B. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70(1), 1-12.
- Crowley, S., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 93-109.
- 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.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., McSweeney, P. L., Faccia, M., Giovine, M., & Gobbetti, M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 259-270.
- 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.
- Diez-Gutiérrez, L., San Vicente, L., Barron, L. J. R., del Carmen Villaran, M., & Chávarri, M. (2020). Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market. *Journal of Functional Foods*, 64, 103669.
- Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., & Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, 69(2), 307-317. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.012>
- Ertop, M. H., & Hayta, M. (2016). Ekşi Hamur Fermantasyonunun Ekmeğin Biyoaktif Bileşenleri ve Biyoyararlanımı Üzerindeki Etkileri. *Gıda*, 41(2), 115-122. <https://dergipark.org.tr/en/pub/gida/issue/43761/537240> adresinden edinilmiştir.
- Escamilla-Montes, R., Luna-Gonzalez, A., del Carmen Flores-Miranda, M., Alvarez-Ruiz, P., Fierro-Coronado, J. A., Sánchez-Ortiz, A. C., & Ávila-Leal, J. (2015). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria suitable for mollusk larvae cultures. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(1), 11.
- Falah, F., Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaee Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. (2021). Optimization of gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. *Food Science & Nutrition*.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(S2), S35-S50. doi: 10.1017/S0007114512004011

- Forkuo, G. S., Nieman, A. N., Yuan, N. Y., Kodali, R., Yu, O. B., Zahn, N. M., Guthrie, M. L. (2017). Alleviation of multiple asthmatic pathologic features with orally available and subtype selective GABAA receptor modulators. *Molecular Pharmaceutics*, 14(6), 2088-2098.
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Bisig, W., Guggisberg, D., Irmeler, S., Jakob, E., & Wechsler, D. (2015). Influence of low pH on the metabolic activity of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* strains in Tilsit-type model cheese. *Dairy Science & Technology*, 95(5), 569-585.
- Gao, D., Chang, K., Ding, G., Wu, H., Chen, Y., Jia, M., Pan, H. (2019). Genomic insights into a robust gamma-aminobutyric acid-producer *Lactobacillus brevis* CD0817. *AMB Express*, 9(1), 1-11.
- Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., & Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*, 37(1), 121-128.
- Grajek, K., Sip, A., Foksowicz-Flaczyk, J., Dobrowolska, A., & Wita, A. (2016). Adhesive and hydrophobic properties of the selected LAB isolated from gastrointestinal tract of farming animals. *Acta Biochimica Polonica*, 63(2), 311-314.
- Gul, K., Singh, A. K., & Jabeen, R. (2016). Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(16), 2617-2627. doi: 10.1080/10408398.2014.903384
- Hassani, A., Procopio, S., & Becker, T. (2016). Influence of malting and lactic acid fermentation on functional bioactive components in cereal-based raw materials: a review paper. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(1), 14-22.
- Higuchi, T., Hayashi, H., & Abe, K. (1997). Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *Journal of Bacteriology*, 179(10), 3362-3364.
- Hsu, Y.-T., Chang, Y.-G., & Chern, Y. (2018). Insights into GABAergic system alteration in Huntington's disease. *Royal Society Open Biology*, 8(12), 180165.
- Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., H-Kittikun, A., & Maneerat, S. (2010). Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 594-601.
- Ispirli, H. (2020). *Lactobacillus reuteri* E81'de kodlanan glukansükraz ve glukano transferaz enzimlerinin biyokimyasal karakterizasyonu, bu enzimler ile özgün prebiyotik oligosakkaritlerin üretimi. (Doktora Tezi) Yüksek Öğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi (Tez no: 636314).
- Jang, H. J., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2019). Probiotic characterization of *Lactobacillus brevis* KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1521-1528.

- Jang, H. J., Song, M. W., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2018). Antioxidant effects of live and heat-killed probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from kimchi. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 3174-3180.
- Kaizu, H., Sasaki, M., Nakajima, H., & Suzuki, Y. (1993). Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2493-2499.
- Kalueff, A. V., & Nutt, D. J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and Anxiety*, 24(7), 495-517.
- Kantachote, D., Ratanaburee, A., Sukhoom, A., Sumpradit, T., & Asavaroungpipop, N. (2016). Use of γ -aminobutyric acid producing lactic acid bacteria as starters to reduce biogenic amines and cholesterol in Thai fermented pork sausage (Nham) and their distribution during fermentation. *LWT*, 70, 171-177. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.041>
- Kariyawasam, K. M. G. M. M., Yang, S. J., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2020). Probiotic properties of *Lactobacillus brevis* KU200019 and synergistic activity with fructooligosaccharides in antagonistic activity against foodborne pathogens. *Food Science of Animal Resources*, 40(2), 297.
- Kerovuo, J. (2000). *A novel phytase from Bacillus: characterization and production of the enzyme*. (Academic Dissertation). To be presented with the permission of the Faculty of Science of the University of Helsinki, for public criticism in Auditorium XII.
- Kim, J. Y., Lee, M. Y., Ji, G. E., Lee, Y. S., & Hwang, K. T. (2009). Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International Journal of Food Microbiology*, 130(1), 12-16.
- Kim, M.-J., & Kim, K.-S. (2012). Isolation and identification of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Kimchi. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55(6), 777-785.
- Kim, Y.-O., Kim, H.-K., Bae, K.-S., Yu, J.-H., & Oh, T.-K. (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(1), 2-7.
- 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.
- Kotzamanidis, C., Kourelis, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., & Yiangou, M. (2010). Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 154-163.
- Kwon, S. Y., & Lee, S. P. (2018). Enrichment of gamma-aminobutyric acid (GABA) in old antler extract fermented by *Lactobacillus plantarum*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 37-43.

- Lacroix, N., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Fortin, J., & Vuilleumard, J. C. (2010). Characterization of aromatic properties of old-style cheese starters. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3427-3441. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2795>
- Laroute, V., Mazzoli, R., Loubière, P., Pessione, E., & Coccagn-Bousquet, M. (2021). Environmental Conditions Affecting GABA Production in *Lactococcus lactis* NCDO 2118. *Microorganisms*, 9(1), 122.
- Laroute, V., Yasaro, C., Narin, W., Mazzoli, R., Pessione, E., Coccagn-Bousquet, M., & Loubière, P. (2016). GABA production in *Lactococcus lactis* is enhanced by arginine and co-addition of malate. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1050.
- 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, H., & Cao, Y. (2010). Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino acids*, 39(5), 1107-1116.
- Li, H., Qiu, T., Chen, Y., & Cao, Y. (2011). Separation of gamma-aminobutyric acid from fermented broth. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(12), 1955-1959. doi: 10.1007/s10295-011-0984-x
- Li, H., Qiu, T., Gao, D., & Cao, Y. (2010). Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino Acids*, 38(5), 1439-1445.
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y. (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 1-7.
- Li, Q., Chen, Q., Ruan, H., Zhu, D., & He, G. (2010). Isolation and characterisation of an oxygen, acid and bile resistant *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Qq08. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(8), 1340-1346.
- Lim, H. S., Cha, I.-T., Roh, S. W., Shin, H.-H., & Seo, M.-J. (2017). Enhanced production of gamma-aminobutyric acid by optimizing culture conditions of *Lactobacillus brevis* HYE1 isolated from kimchi, a Korean fermented food. *J Microbiol Biotechnol*, 27(3), 450-459.
- Lim, S.-M., & Im, D.-S. (2009). Screening and Characterization of Pro biotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean Fermented Foods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 178-186.
- Lin, Q. (2013). Submerged fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* YS9 for γ -aminobutyric acid (GABA) production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 183-187.
- Lin, Q., Li, D., & Qin, H. (2017). Molecular cloning, expression, and immobilization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus fermentum* YS2. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 8-13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.002>
- Lopez-Varela, S., González-Gross, M., & Marcos, A. (2002). Functional foods and the immune system: A review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(3), S29-S33.

- Lu, X., Xie, C., & Gu, Z. (2009). Optimisation of fermentative parameters for GABA enrichment by *Lactococcus lactis*. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(6), 433-442.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Guigas, C., Franz, C., & Holzapfel, W. H. (2008). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Current Microbiology*, 56(4), 315-321.
- Mazzoli, R., Pessione, E., Dufour, M., Laroute, V., Giuffrida, M. G., Giunta, C., Loubière, P. (2010). Glutamate-induced metabolic changes in *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during GABA production: combined transcriptomic and proteomic analysis. *Amino Acids*, 39(3), 727-737.
- Mele, M., Costa, R. O., & Duarte, C. B. (2019). Alterations in GABAA-receptor trafficking and synaptic dysfunction in brain disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 77.
- Mohammadi-Kouchesfahani, M., Hamidi-Esfahani, Z., & Azizi, M. H. (2019). Isolation and identification of lactic acid bacteria with phytase activity from sourdough. *Food Science & Nutrition*, 7(11), 3700-3708.
- Möhler, H. (2012). The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 62(1), 42-53.
- Nejati, F., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2013). Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA). *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 183-189.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., & Suzuki, I. (1998). Production of γ -Aminobutyric Acid By Cheese Starters During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 81(6), 1486-1491. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75714-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75714-5)
- Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y., Kobayashi, M., Kimoto, H., Suzuki, I., & Aso, H. (1999). *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology*, 145(6), 1375-1380.
- Oliveira, L. d. C., Silveira, A. M., Monteiro, A. d. S., Dos Santos, V. L., Nicoli, J. R., Azevedo, V. A. d. C., Nardi, R. (2017). In silico prediction, in vitro antibacterial spectrum, and physicochemical properties of a putative bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain L156. 4. *Frontiers in Microbiology*, 8, 876.
- Önal, D., Beyatlı, Y., & Aslım, B. (2005). Probiyotik bakterilerin epitel yüzeylere yapışması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(9), 1-10. <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050901.pdf> adresinden edinilmiştir.
- Önür, N. D., & Beyler, A. R. (2001). Safra Asitleri Metabolizması. <https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/> adresinden edinilmiştir.

- Ozen, A. E., Pons, A., & Tur, J. A. (2012). Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 70(8), 472-481.
- 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. (2020). Enhanced production of γ -aminobutyric acid (GABA) using *Lactobacillus plantarum* EJ2014 with simple medium composition. *LWT*, 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.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67 (2), 309-317.
- Pérez-Chabela, M. d. L., Totosa, A., & Guerrero, I. (2008). Evaluation of thermotolerant capacity of lactic acid bacteria isolated from commercial sausages and the effects of their addition on the quality of cooked sausages. *Food Science and Technology*, 28 (1), 132-138.
- Pérez-Chabela, M. L., Lara-Labastida, R., Rodríguez-Huezo, E., & Totosa, A. (2013). Effect of spray drying encapsulation of thermotolerant lactic acid bacteria on meat batters properties. *Food and Bioprocess Technology*, 6 (6), 1505-1515.
- Raghavendra, P., & Halami, P. M. (2009). Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 133 (1-2), 129-134.
- 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.
- Read, A. F., & Woods, R. J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2014 (1), 147.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84 (3), 197-215.
- Sanchart, C., Rattanaporn, O., Haltrich, D., Phukpattaranont, P., & Maneerat, S. (2017a). 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

- Sanchart, C., Rattanaporn, O., Haltrich, D., Phukpattaranont, P., & Maneerat, S. (2017b). *Lactobacillus futsaii* CS3, a new GABA-producing strain isolated from Thai fermented shrimp (Kung-Som). *Indian Journal of Microbiology*, 57 (2), 211-217.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Smidt, H., Saarela, M., Mättö, J., & de Vos, W. M. (2003). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology*, 26 (4), 572-584.
- Shakibaie, M., Mohammadi-Khorsand, T., Adeli-Sardou, M., Jafari, M., Amirpour-Rostami, S., Ameri, A., & Forootanfar, H. (2017). Probiotic and antioxidant properties of selenium-enriched *Lactobacillus brevis* LSe isolated from an Iranian traditional dairy product. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 1-9.
- Sherwin, E., Sandhu, K. V., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). May the force be with you: the light and dark sides of the microbiota–gut–brain axis in neuropsychiatry. *CNS drugs*, 30(11), 1019-1041.
- 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.
- Sifeeldein, A., Xianjun, Y., Zhihao, D., Junfeng, L., Youns, H., & Tao, S. (2018). Characterization and identification of lactic acid bacteria by 16S rRNA gene sequence and their effect on the fermentation quality of Elephant grass (*Pennisetum purpureum*) silage. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(1).
- Sigel, E., & Steinmann, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40224-40231.
- 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.
- Sita, K., & Kumar, V. (2020). Role of Gamma Amino Butyric Acid (GABA) against abiotic stress tolerance in legumes: a review. *Plant Physiology Reports*, 1-10.
- Song, H. Y., & Yu, R. C. (2018). Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production in fermented adzuki bean milk. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 74-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.024>
- Spelhaug, S. R., & Harlander, S. K. (1989). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Protection*, 52(12), 856-862.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., & Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307.

- Tajabadi, N., Baradaran, A., Ebrahimpour, A., Rahim, R. A., Bakar, F. A., Manap, M. Y. A., Saari, N. (2015). Overexpression and optimization of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis 362 for high gamma-aminobutyric acid production. *Microbial Biotechnology*, 8(4), 623-632.
- Tajabadi, N., Ebrahimpour, A., Baradaran, A., Rahim, R. A., Mahyudin, N. A., Manap, M. Y. A., Saari, N. (2015). Optimization of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 from honeybees. *Molecules*, 20(4), 6654-6669.
- Tuberoso, C. I. G., Congiu, F., Serreli, G., & Mameli, S. (2015). Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chemistry*, 175, 29-35.
- Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., & Oda, K. (1997). Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(7), 1168-1171.
- Vermeulen, N., Gänzle, M. G., & Vogel, R. F. (2007). Glutamine deamidation by cereal-associated lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1197-1205.
- Victoria-León, T., Totosaús, A., Guerrero, I., & Pérez-Chabela, M. (2006). Efecto De Bacterias Ácido Lácticas Termoresistentes En Salchichas Cocidas Thermoresistan Lactic Acid Bacteria Effect on Cooked Sausages. *CYTA-Journal of Food*, 5(2), 135-141.
- 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>
- Yalçınkaya, S., Kılıç, G. B., & Çakmakçı, A. G. K. (2019). The Importance of Gamma Aminobutyric Acid Produced by Lactic Acid Bacteria. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(8), 1094-1099.
- Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Dyachkova, M. S., Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Averina, O. V., Danilenko, V. N. (2016). GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe*, 42, 197-204. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.011>
- Zamudio, M., Gonzalez, A., & Medina, J. (2001). *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters in Applied Microbiology*, 32(3), 181-184.
- 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.
- Zareie, Z., Yazdi, F. T., & Mortazavi, S. A. (2019). Optimization of gamma-aminobutyric acid production in a model system containing soy protein and inulin by *Lactobacillus brevis* fermentation. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(4), 2626-2636.

ÖZGEÇMİŞ

.....,’ dat’ da doğdu. İlk ve orta öğrenimimiİlköğretim Okulu’ nda tamamladı. yılında Anadolu Lisesi’ nden mezun oldu. eğitim öğretim yılında Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’ ne yerleşti. yılında Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’ ne yatay geçiş yaptı ve bölümümüyılında bitirdi. Aynı yıl Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı’ nda yüksek lisansa başladı.

