

GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID (GABA) PRODUCTION BY FERMENTATION IN AEROBIC ATMOSPHERE

Jozef Hudec, Róbert Mazúr, Lubomír Kobida, Pavol Trebichalský

ABSTRACT

The concentration of γ -aminobutyric acid (GABA) from fermentation processes of the sodium L-glutamate transformation in different broths, in presence of different fibrous fungus, yeasts, and bacteria, mainly lactic acid bacteria isolated from a variety of foods by HPLC method were determined. The highest selectivity of GABA formation (20.95%) after 108 h of sodium L-glutamate fermentation in MRS broth, in presence of lactic acid bacteria isolated from Niva cheese, at 33 °C were determined. For augmentation of selectivity the application of the further stimulating factors of GABA biosynthesis is needed.

Keywords: fibrous fungi, yeast, bacteria, γ -aminobutyric acid, food sources

INTRODUCTION

Kyselina γ -aminomaslová (GABA) je hlavným inhibičným neurotransmitterom v centrálnom nervovom systéme (CNS) (Huang et al., 2007) a esenciálna pre celkovú rovnováhu medzi neuronálnou excitáciou a inhibíciou. GABA má mnohé fyziologické funkcie, ako sú prenos nervového vzruchu, indukcia hypotenzie, diuretické a upokojujúce účinky (Wong et al., 2003), podporuje vylučovanie inzulínu v pankrease (Siragusa et al., 2007), moduluje kardiovaskulárne a respiračné funkcie pôsobením nielen v CNS ale aj v periférnych tkanivách (de Feudis, 1982), zlepšuje pamäť, výdrž pri cvičení, redukuje p 38 MAP kinázne signály (Spangelo et al., 2004), čo môže redukovať zápalové procesy v kĺboch ap. Nízka hladina GABA v organizme je spojená s niektorými psychiatrickými a neurologickými poruchami, vrátane nepokoja, depresie, epilepsie (Van Blercom et al., 2004).

GABA je prítomná v malých množstvách v mnohých rastlinných zdrojoch, zelenine, napr. špenáte, zemiakoch, kapuste šparglovej (brokolici), rajčiakoch, v ovocí, napr. jablkách, hrozne, v cereáliách, napr. jačmeni, kukurici (Oh et al., 2003). Vo zvýšenom množstve sa nachádza najmä vo fermentovaných produktoch, hlavne v kyslomliečnych (Hayakawa et al., 2004), sójovej omáčke (Yamakoshi et al., 2007), syroch (Siragusa et al., 2007) ap. Vo vysokých koncentráciách môže byť produkovaná najmä niektorými druhmi baktérií mliečneho kvasenia. Najčastejšie sa používajú *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* susp. *Bulgaricus*, ale aj iné mikroorganizmy, napr. *Rhizopus microsporus* (Watanabe et al., 2007), *Monascus purpureus*, *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces cinereus* (Bown, Shelp, 1997) a ďalšie. Nedávno bola GABA schválená na použitie ako zložka funkčných potravín v rôznych druhoch potravín v Japonsku a USA kvôli jej zdravotnému efektu.

GABA je v organizme biosyntetizovaná prevažne za katalýzy glutamátdekarboxylázou (GAD) a jej kofaktora pyridoxal-5-fosfátu (P5P) ireverzibilnou dekarboxyláciou z kyseliny glutámovej (Ueno, 2000). Pri syntéze mikrobiálnou cestou sa využíva ako

prekursor kyselina glutámová, častejšie jej sodná soľ alebo prírodné rastlinné zdroje s vysokým obsahom bielkovín obsahujúcich kyselinu glutámovú.

Keďže cieľom nášho výskumného snaženia nie je len vyvinúť produkty so zvýšeným obsahom GABA, ale aj s prírodnými zložkami prejavujúcimi preventívnu kardio-, neuro- alebo kanceroprotektívnu aktivitu, výsledky uvedené v tejto práci predstavujú zatiaľ naše neoptimálne výskumné kroky z pohľadu selektivity tvorby GABA.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Zdroje mikroorganizmov. Boli použité nasledovné suroviny ako zdroje mikroorganizmov: E₁ – biela vláknitá huba z povrchu syra Encián, E₂ – baktérie odobraté z cestom Enciánu mimo vláknitej huby, NI₁ – modrá vláknitá huba zo syra Niva, NI₂ – baktérie odobraté z Nivou mimo vláknitej huby, C – mikroorganizmy odobraté z cmarom, B – mikroorganizmy odobraté s kvasiacou časťou starého banánu, PK – *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (pekárske droždie), VK – *Saccharomyces cerevisiae* (suché vínné kvasinky) Klosterneuburg. Hmotu s mikroorganizmami sme získali v sterilnom prostredí podľa zásad správnej laboratórnej práce v mikrobiologickom laboratóriu za pomoci sterilného bakteriálneho očka. Odobralo sa 0,5 g materiálu, ktorý sa vložil do vopred vysterilizovanej skúmavky so zátkou, do 5 ml príslušného bujónu. Na predkultiváciu kvasiniek a vláknitých húb bol použitý Czapek-Doxov bujón (CzD), na predkultiváciu baktérií Mueller-Hintonov alebo MRS bujón. Zloženie mikrobiálnej zmesi bude identifikované len v najvhodnejšej potravinárskej surovine, s ktorou sa dosiahne v nasledujúcich experimentoch najvyššia selektivita tvorby GABA, s predpokladom jej využitia v praxi. Mikroorganizmy z každého potravinového zdroja boli kultivované v rôznych médiách (vo fáze stanovenia optimálneho počtu aktívnych kolónií buniek), preto sa uvádza aj Mueller-Hintonov bujón. Keďže mnohé z použitých potravinových zdrojov (Encián, Niva, cmar) sú produkty mliekarenského priemyslu, bol predpoklad, že použitie MRS bujónu, najmä pre ne bude najvhodnejšie. Vo variantoch, ktoré boli zaradené do tabuliek 1 a 2, Mueller-Hintonov bujón nebol použitý, z dôvodu menšej vhodnosti.

Fermentácia. Pred fermentačnými experimentami stanovenú (za konštantných teplotných podmienok) optimálnu dobu kultivácie a pH na agaroch z hľadiska počtu aktívnych kolónií buniek (10-100 buniek/príslušné živné médium v Petriho miske) v inokule použili sme vždy pri predkultivácii mikroorganizmov (0,5 g zdroja/5 ml bujónu). Celý objem 5 ml suspenzie mikroorganizmov, inokulum cca 10^7 až 10^9 buniek podľa zdroja, sme vnášali do procesu produkcie GABA mikrobiálnou cestou. Do 50 ml príslušného bujónu sa pridalo L-glutaman sodný (1 g), upravilo sa pH na optimum (vopred stanovené z hľadiska maximálneho počtu mikroorganizmov na agaroch) pre príslušné mikroorganizmy alebo na požadované pH s kyselinou mravčou. Pridala sa predkultivovaná suspenzia mikroorganizmov v objeme 5 ml bujónu. Fermentácia v aeróbných podmienkach sa uskutočnila za konštantných teplotných podmienok. Vzorok sa odoberali v pravidelných intervaloch v objeme 1 ml. pH fermentačnej zmesi sa upravovalo pravidelne po každom odbere vzorky za sterilných podmienok. Každý variant bol trikrát opakovaný. Varianty v prvom bloku experimentov (zdroje mikroorganizmov; bujón; teplota v °C; pH) (tabuľka 1) boli nasledovné: 1. NI₁; CzD; 23; 5,0. 2. PK; CzD; 23; 4,0. 3. VK; CzD; 23; 4,0. 4. B; CzD; 23; 5,0. 5. E₁; CzD; 23; 4,0. 6. PK; CzD; 30; 4,0. 7. PK; CzD; 30; 6,5. 8. PK; MRS; 30; 6,5. 9. PK; MRS; 37; 6,5. Varianty v druhom bloku experimentov (vo všetkých bol použitý MRS bujón a pH 6,5) (tabuľka 2), preto ďalej uvádzame len zdroj mikroorganizmov a teplotu fermentácie: 1. C; 30. 2. C; 33. 3. C; 37. 4. E₂; 30. 5. E₂; 33. 6. E₂; 37. 7. NI₂; 30. 8. NI₂; 33. 9. NI₂; 37.

Spracovanie vzorky: K odobratej vzorke (vodný roztok) sa pridalo 4,2 ml 96 % etanolu. Po 2 min intenzívnom trepaní sa zmes nechala stáť 1 h pri laboratórnej teplote a následne sa filtrovala. Známy objem filtrátu sa odľúkal s plynným dusíkom do sucha. Pred chromatografickou analýzou sa vzorka rozpustila v 1 ml nasýteného roztoku Na₂CO₃. Roztok sa kvantitatívne preniesol do 50 ml tuby, pridali sa 4 ml nasýteného roztoku Na₂CO₃, acetónový roztok dansylchloridu a pri teplote 60 °C sa vzorka 60 min derivatizovala. Na ukončenie dansylácie pridala sa 1 ml roztoku L- alanínu ($100\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vody) a nechal sa reagovať 30 min pri 60 °C. Acetón z tuby sa odparil zahrievaním pri 40 °C. Dansylovaná GABA sa vyextrahovala prudkým 1 min trepaním do 5 ml dietyléteru a extrakcia sa ešte raz zopakovala. Spojené extrakty sa centrifugovali 10 min pri 4500 g a po oddelení fáz sa odobral presný objem dietyléterovej fázy, odparil do sucha a následne sa rozpustil v mobilnej fáze (MF), z ktorej sa injektovalo 20 µl do HPLC prístroja.

Stanovenie GABA. Na stanovenie obsahu GABA vo vzorkách sa použil HPLC prístroj Waters Breeze s detektorom Waters UV-2487. Separácia sa dosiahla na reverznej fáze kolóny C-18 (Waters Nova Pack) veľkosti 150x3,9 mm, 3 µm. Teplota kolóny bola udržiavaná pri 35 °C a rýchlosť prietoku MF bola $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. MF: rozpúšťadlom A bola 0,2 % H₃PO₄ a rozpúšťadlom B metanol. Elučné podmienky boli nasledovné: 90 % A, 0-1 min; lineárny gradient od 90 % A do 40 % A, 1-7 min; izokratická elúcia pri 40 % A od 7-10 min; lineárny gradient od 40 % A do 90 % A od 10-11 min a 90 %

A od 11-14 min (Naval et al., 2006). Identifikácia GABA bola založená na retenčnom čase štandardu a jeho UV absorpčnom spektre pri 256 nm. Kvantifikácia sa uskutočnila za pomoci externého štandardu.

Všetky hodnoty v tabuľkách sú vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchylka.

RESULTS AND DISCUSSION

Kvasinky a vláknité mikroskopické huby použité v prvom bloku experimentov pri teplote 23 °C (všeobecne odporúčané pre optimálnu kultiváciu v prítomnosti týchto mikroorganizmov sú teploty 25 ± 1 °C) produkovali GABA s veľmi nízkou selektivitou. Hlavnou príčinou je pravdepodobne veľmi nízka aktivita GAD v nich. Najväčšie množstvo GABA za týchto podmienok ($147,8\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ fermentačného média) vyprodukovala biela vláknitá huba z Enciánu po 120 h fermentácie v CzD bujóne pri pH 4,0 (tabuľka 1). Toto množstvo GABA predstavuje len 1,34 % selektivitu. Pekárske kvasinky dosiahli maximálnu produkciu GABA po 132 h fermentácie ($89,8\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), čo je len 0,81 % selektivita tvorby GABA. Keďže vplyv pH a teploty na biosyntetické procesy je nepopierateľný, do tohto bloku experimentov boli zaradené aj ďalšie varianty s pekárskymi kvasinkami, pri ktorých sa menila buď teplota alebo pH fermentačnej zmesi, prípadne obidva faktory, ako aj druh použitého bujónu.

Zvýšenie teploty fermentačnej zmesi na 30 °C akcelerovalo tvorbu GABA, keďže jej maximálna produkcia bola stanovená už po 60 h fermentácie a súčasne mierne zvýšilo selektivitu produkcie GABA (2,73 % selektivita, t.j. $302,2\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Zmena pH CzD bujónu na 6,5 pri 30 °C fermentácie malo pochopiteľne negatívny vplyv na biosyntézu GABA, podobne ako na množenie PK, stanovené už na agaroch. Zmena druhu bujónu pri tom istom pH 6,5 a teplote 30 °C, použitie MRS bujónu nemalo žiaden vplyv na intenzitu biosyntézy GABA (dosiahla sa 2,76 % selektivita jej tvorby) v porovnaní s použitím CzD bujónu. Pri tomto pH (6,5), optimálnom pre MRS bujón, ďalšie zvýšenie teploty na 37 °C opäť zvýšilo selektivitu produkcie GABA z L-glutamanu sodného na 4,06 %, čo bol stále neuspokojivý výsledok.

Použitie baktérií, najmä baktérií mliečneho kvasenia je pre ich značne vyššiu GAD aktivitu preferované viacerými autormi (Ueno et al., 2010; Watanabe et al., 2007; Rizello et al., 2008; Siragusa et al., 2007). V počiatočnej fáze výskumu nebolo zámerom použiť selektívne určité kmeň, ale zrejme zmes viacerých, izolovaných z rastlinných a živočíšnych surovín. V ďalšom bloku experimentov bol za použitia konštantného kultivačného média (MRS bujónu) s pH 6,5 hodnotený vplyv zdroja mikroorganizmov a teploty fermentačného média na biosyntézu GABA.

Obsah mikroorganizmami vyprodukovanej GABA kulminoval pri teplote média 33 °C nezávisle na použitom zdroji mikroorganizmov. V prípade použitia baktérií mliečneho kvasenia z cmaru sa vyprodukovalo maximálne množstvo inhibičného neurotransmitera $714,8\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ média po 120 h fermentácie, v prípade laktobaktérií z Enciánu $1794,4\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ média po 144 h fermentácie. Najaktívnejšie boli baktérie zo syra Niva, ktoré po 108 h vyprodukovali $2319,8\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ média, čo predstavuje 20,95 % selektivitu. Vyprodukované množstvo GABA

závisí aj od množstva a aktivity degradačných enzýmov GABA. Napr. GABA transamináza katalyzuje reverzibilnú konverziu GABA na semialdehyd kyseliny jantrovej, pričom použije ako akceptory aminoskupiny buď kyselinu pyrohroznovú alebo kyselinu α -ketoglutárovú (Shelp et al., 1999). Súčasne treba brať do úvahy, že biosyntéza sa uskutočnila v aeróbnych podmienkach, limitujúcich selektivitu tvorby GABA a skutočnosť, že nebol použitý katalyzátor enzymatického procesu, kofaktor GAD, pyridoxal-5-fosfát, ďalej podľa výsledkov Bai et al. (2009) bolo použité vysoké, až inhibične pôsobiace množstvo prekursora, navyše proces bol uskutočnený bez miešania fermentačného média atď.

CONCLUSION

Na zabezpečenie nových druhov potravín so zvýšenou neuro-, kardio- alebo kanceroprotektívnou aktivitou potenciálne označovaných ako „potraviny so zvýšenými zdravými prospešnými účinkami“ je potrebné uvažovať nielen s prídavkami špeciálnych prírodných zložiek – zdravie protektívnych aditív, ale aj s využitím fermentačných procesov v pôvodných, bázu potraviny tvoriacich surovinách. V zhode s uvedenými výsledkami možno konštatovať, že pre biosyntézu GABA nie sú z hľadiska efektivity jej tvorby vyhovujúce v experimente použité kvasinky a vláknité mikroskopické huby. V neoptimálnych aeróbnych podmienkach, najvyššia selektivita tvorby GABA bola dosiahnutá s použitím baktérií mliečneho kvasenia, prítomných v syre Niva, dekarboxyláciou jej prekursora v MRS bujone pri 33 °C.

REFERENCES

BAI, Q., CHAI, M., GU, Z., CAO, X., LI, Y., LIU, K. 2009. Effect of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and γ -aminobutyric acid accumulation in foxtail millet (*Setaria italica* L.) during germination. In *Food Chem.*, vol. 116, 2009, p. 152-157.

BOWN, A. W., SHELP, B. J. 1997. The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. In *Plant Physiol.*, vol. 115, 1997, p. 1-5.

DE FEUDIS, F.W. 1982. Muscimol and GABA receptor: basic studies and therapeutic implications. In *Rev. Pure Appl. Pharmacol. Sci.*, vol. 3, 1982, p. 319-379.

HAYAKAWA, K., KIMURA, M., KASAHARA, K., MATSUMOTO, K., SANSAWA, H., YAMORI, Y. 2004. Effect of gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar – Kyoto rats. In *Br. J. Nutr.*, vol. 92, 2004, p. 411-417.

HUANG, J., MEI, L., WU, H., LIN, D. 2007. Biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. In *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, 2007, no. 4, p. 865-871.

NAVAL, M. V., GOMEZ-SERRANILLOS, M. P., CARRETERO, M. E., De ARCE, C. 2006. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in the determination of *Panax ginseng radix*

extract effect in cultured neurons. In *J. Chromat.*, vol. 1121, 2006, no. 2, p. 242-247.

OH, S.-H., MOON, Y.-J., OH, C.-H. 2003. γ -Aminobutyric acid (GABA) content of selected uncooked foods. In *Nutraceuticals Food*, vol. 8, 2003, p. 75-78.

RIZZELLO, C. G., CASSONE, A., DI CAGNO, R., GOBBETTI, M. 2008. Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, 2008, p. 6936-6943.

SHELP, B., BOWN, A., Mc LEAN, M. 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. In *Trends Plant Sci.*, vol. 4, 1999, p. 446-452.

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. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, 2007, no. 22, p. 7283-7290.

SPANGELO, B. L., HORELL, S., GOODWIN, A. L., SHROFF, S., JARVIS, W. D. 2004. Somatostatin and gamma-aminobutyric acid inhibit interleukin-1 beta-stimulated release of interleukin-6 from rat C6 glioma cells. In *Neuroimmunomodulation*, vol. 11, 2004, p. 332-340.

UENO, S. 2000. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. In *J. Mol. Catal.*, vol. 10, 2000, no. 1-3, p. 67-69.

UENO, S., SHIGEMATSU, T., WATANABE, T., NAKAJIMA, K., MURAKAMI, M., HAYASHI, M., FUJII, T. 2010. Generation of free amino acids and γ -aminobutyric acid in water-soaked soybean by high-hydrostatic pressure processing. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, 2010, p. 1208-1213.

VAN BLERCOM, N., LASA, A., WERGER, K. 2004. Effect of gabapentin on the motor response to levodopa: a double-blind, placebo-controlled, crossover study in patient with complicated Parkinson disease. In *Clin. Neuropharmacol.*, vol. 27, 2004, no. 3, p. 124-128.

WATANABE, N., FUJIMOTO, K., AOKI, H. 2007. Antioxidant activities of the water-soluble fraction in tampeh-like fermented soybean (GABA-tempeh). In *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 58, 2007, no. 8, p. 577-587.

WONG, C. G., BOTTIGLIERI, T., SNEAD, O. C. 2003. GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. In *Ann. Neurol.*, vol. 54, 2003, no. 6, p. 3-12.

YAMAKOSHI, J., FUKUDA, S., SATOH, T., TSUJI, R., SAITO, M., OBATA, A., MATSUYAMA, A., KIKUCHI, M., KAWASAKI, T. 2007. Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. In *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 71, 2007, p. 165-173.

Acknowledgments:

This article was a part of the project VEGA 1/0512/09.

Contact address:

Jozef Hudec, Department of Agrochemistry and Plant Nutrition, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Jozef.Hudec.AF@uniag.sk

Róbert Mazúr, Department of Agrochemistry and Plant Nutrition, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: robert.mazur85@gmail.com
Eubomír Kobida, Department of Sustainable Agriculture and Herbology, Slovak University of Agriculture, Trieda

A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: kobida@afnet.uniag.sk
Pavol Trebichalský, Department of Chemistry, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: palotre@gmail.com