

## ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN KHẢ NĂNG SINH GABA BỞI CHỦNG *Lactobacillus pentosus* R1

Đỗ Thị Bích Thủy<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Kim Chi<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Đan Huyền<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

<sup>2</sup> Chi cục An toàn vệ sinh thực phẩm tỉnh Gia Lai

### TÓM TẮT

Gamma - aminobutyric acid (GABA) hoạt động như một chất ức chế dẫn truyền thần kinh chính trong hệ thống thần kinh trung ương. Hợp chất này có thể được tổng hợp bởi vi khuẩn, nấm mốc hoặc từ hạt ngũ cốc nảy mầm. Trong số các nhóm vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp GABA, vi khuẩn lactic (LAB) được xem là nhóm vi khuẩn an toàn nhất. Nghiên cứu này đã khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp GABA bởi chủng *Lactobacillus pentosus* R1. Hàm lượng GABA trong các mẫu thí nghiệm được xác định bằng phương pháp HPLC. Kết quả cho thấy hàm lượng GABA đạt cao nhất khi chủng *Lactobacillus pentosus* R1 được nuôi cấy trong môi trường MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) có bổ sung 2% monosodium glutamate (MSG), pH ban đầu bằng 7 và nhiệt độ nuôi cấy 40°C. Trong các điều kiện nuôi cấy tối ưu đó hàm lượng GABA đạt được trong môi trường là 2195,2 ± 60,4 mg/L. Những thông tin về *L. pentosus* R1 với khả năng sản sinh GABA là một bước đột phá quan trọng cho sự phát triển các loại thực phẩm chức năng.

Từ khóa: GABA, *Lactobacillus pentosus* R1, MSG, nhiệt độ, pH.

### MỞ ĐẦU

GABA (Gamma - aminobutyric acid) là một amino acid phi protein có bốn cacbon, có mặt ở động vật, thực vật và vi sinh vật. Cùng với niacinamide và inositol, GABA ngăn cản các dẫn truyền căng thẳng và bất an đến vùng thần kinh trung ương bằng việc chiếm giữ các vùng tiếp nhận tin của các tế bào này, khống chế các vùng tiếp nhận thông tin, do đó GABA đóng vai trò chính trong việc giảm hoạt động của các neuron thần kinh và ức chế sự lan truyền của các tế bào dẫn truyền, từ đó làm giảm stress, căng thẳng và chứng mất ngủ (Jin *et al.*, 2011). Thiếu GABA, con người trở nên căng thẳng, mệt mỏi, mất ngủ, trầm cảm.

Với những công dụng đầy hứa hẹn đối với sức khỏe của GABA, trong những thập niên gần đây, số lượng các nghiên cứu tìm các giải pháp làm giàu hàm lượng hợp chất này trong thực phẩm ngày càng tăng. Mặc dù GABA được tìm thấy với hàm lượng lớn trong não động vật có vú, nhưng nguồn này không thể áp dụng được trong sản xuất; hàm lượng GABA sinh tổng hợp được trong thực vật thấp, vì vậy nguồn sinh tổng hợp GABA từ vi sinh vật chiếm nhiều ưu điểm hơn cả. *E. coli* là vi sinh vật đầu tiên được ứng dụng trong sản xuất GABA. Tuy nhiên, việc sử dụng *E. coli* trong sản xuất gặp nhiều khó khăn và sự có mặt của chủng này trong sản phẩm lên men có thể nguy hiểm cho con người. Một số chất độc trong quá trình tổng hợp GABA bởi chủng *E. coli* là nguyên nhân gây một số bệnh ở người (Dhakal *et al.*, 2012). Vi khuẩn lactic (LAB) là nhóm vi sinh vật được xem là an toàn nhất trong việc ứng dụng vào bảo quản và chế biến thực phẩm. Bên cạnh tác dụng bảo quản thực phẩm do khả năng sinh tổng hợp lactic acid và bacteriocin, chúng còn có tiềm năng probiotic như khả năng làm giảm cholesterol, kích thích hoạt động của hệ miễn dịch, ức chế sự phát triển của vi sinh vật có hại trong đường ruột... Đặc biệt, vi khuẩn lactic đã được ứng dụng để lên men và thu được hàm lượng lớn GABA. Gần đây, trên thế giới nhiều công trình nghiên cứu có liên quan đến việc tìm kiếm các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp GABA cao, tối ưu hóa điều kiện lên men sinh tổng hợp GABA cao (Haixing *et al.*, 2010) cũng như sử dụng nhóm vi khuẩn này trong sản xuất thực phẩm (Di Cagno *et al.*, 2010).

Ruốc là một loại thực phẩm lên men có độ mặn cao, được sử dụng như là một gia vị khá phổ biến ở miền Trung nói chung và ở Huế nói riêng. Hệ vi khuẩn lactic trong sản phẩm này rất phong phú và đa dạng, tuy nhiên, các nghiên cứu về hệ vi khuẩn lactic trong sản phẩm này hầu như chưa được quan tâm. Do những tính chất có lợi cùng với khả năng sinh tổng hợp GABA của vi khuẩn lactic nên việc nghiên cứu tìm kiếm nguồn vi khuẩn lactic, tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và ứng dụng vào sản xuất lên men thực phẩm đã bắt đầu được nghiên cứu bởi các nhà khoa học trên thế giới. Tuy nhiên, các công bố trong nước về sản xuất GABA từ LAB vẫn còn rất hạn chế và việc sử dụng các chủng LAB được phân lập từ ruốc Huế để sinh tổng hợp GABA là chưa có công bố. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát việc bổ sung monosodium glutamate vào môi trường nuôi cấy, thay đổi pH

ban đầu và nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *Lactobacillus pentosus* R1 đã được phân lập từ nước Huế.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chủng *Lactobacillus pentosus* R1 được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Vi sinh, Khoa Cơ khí và Công nghệ, Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

### Phương pháp Phân tích hàm lượng GABA (Syu *et al.*, 2008)

Dịch nuôi cấy vi khuẩn đã được ly tâm tách tế bào có chứa GABA (1 mL) được hòa loãng với 9 mL nước khử ion. Hỗn hợp sau khi lắc ở 160 vòng/phút trong 90 phút, nhiệt độ phòng được thêm 1 mL acid sulfosalicylic 3% và ly tâm (HermleLabotechnik Z323K) ở 6.000 vòng/phút trong 5 phút. Dịch thu được sau ly tâm (100 µl) được thêm vào 100 µl NaHCO<sub>3</sub> 100 mM và 100 µl 4-dimethylaminoazobenzen – 4-sulfonylchloride (Dabsyl-Cl) 4 mM, trong acetonitrile. Hỗn hợp có pH 7,5 - 8, được gia nhiệt ở 70°C trong 20 phút để xảy ra phản ứng tạo dẫn xuất. Phản ứng được dừng lại bằng cách làm mát mẫu và thêm 0,5 mL cồn tuyệt đối, để trên nước đá (0°C) 30 phút và ly tâm ở 16.000 vòng/phút, 4°C trong 5 phút. Cuối cùng, dịch nổi được thu nhận và lọc qua màng lọc 0,22 µm để phân tích trên HPLC. GABA tinh khiết (của hãng Sigma) được sử dụng làm chất chuẩn.

Thông số phân tích trên HPLC: Mô hình HPLC (Shimadzu, Japan) dùng để phân tích GABA gồm: cột C18 có kích thước 25 cm x 4,6 mm, 5 µm (Supelco, Bellefonte, PA). Hệ thống HPLC được vận hành với đầu dò UV-Vis (SPD-20A, Shimadzu) cài đặt bước sóng 465 nm. Pha động được sử dụng là ammonium acetate buffer 25 mM chứa 0,1% acetic acid:acetonitrile (26:74, theo thể tích), tốc độ dòng 1 mL/min, thể tích hút mẫu 10 µL, nhiệt độ cột 55°C.

### Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh GABA của *Lactobacillus pentosus* R1 (Lu *et al.*, 2008)

Việc xác định một số thông số thích hợp cho chủng *Lactobacillus pentosus* R1 có khả năng sinh tổng hợp GABA cao được thực hiện tuần tự theo từng yếu tố một. Điều đó có nghĩa là khi thực hiện thay đổi yếu tố này thì các yếu tố khác được cố định. Theo đó, các yếu tố được khảo sát trong công trình này gồm hàm lượng monosodium glutamate bổ sung làm môi trường MRS (0; 0,5; 1; 1,5; 2, và 2,5%), pH ban đầu (4; 5; 6; 7 và 8) và nhiệt độ nuôi cấy (30; 35; 40; 45 và 50°C). Hàm lượng GABA trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng phương pháp HPLC.

### Phương pháp xử lý số liệu

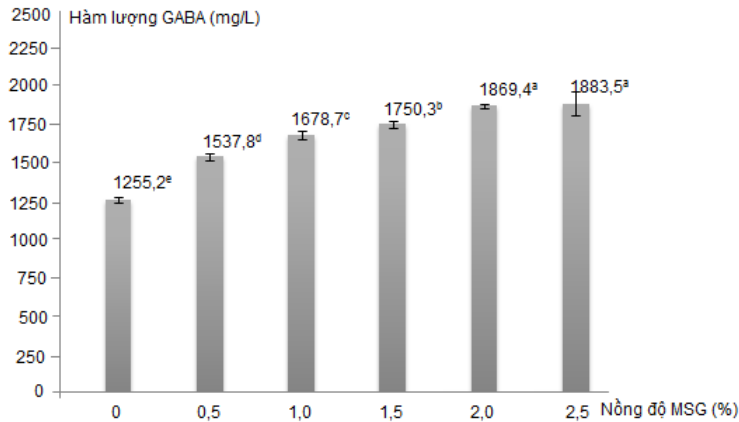
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý thống kê ANOVA trên phần mềm SPSS 20. Sai khác thống kê giữa các trung bình được xác định bằng Duncan's test.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của hàm lượng MSG bổ sung lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *L. pentosus* R1

GABA là sản phẩm chuyển hóa sinh học của glutamate, được xúc tác bởi enzyme glutamate decarboxylase (GAD) trong nhiều tế bào sống trong đó có LAB (lactic acid bacteria). Hoạt tính của GAD càng mạnh thì lượng GABA tạo ra càng nhiều. Monosodium glutamate (MSG) được xem như một nguồn cơ chất chính cho quá trình sản xuất GABA từ vi khuẩn lactic (Diana *et al.*, 2014); tuy nhiên, hầu hết các LAB không có khả năng sinh tổng hợp đủ L-glutamate cho việc sản xuất GABA. Nghiên cứu này xác định hàm lượng MSG được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *L. pentosus* R1 cho khả năng sinh GABA cao nhất.

Hàm lượng GABA tích lũy trong môi trường tăng tỷ lệ thuận với sự tăng nồng độ MSG từ 0 đến 2,5% (w/v (Hình 1). Lượng GABA sinh ra là khác nhau ở các công thức MSG bổ sung khác nhau, sự sản sinh GABA ở các nồng độ khác nhau đều sai khác có ý nghĩa thống kê, thấp nhất ở nồng độ MSG 0% là 1255,2 ± 19,0 mg/L và cao nhất là 1869,4 ± 12,4 mg/L trong môi trường nuôi cấy có bổ sung MSG 2%. Trong môi trường có bổ sung MSG, hàm lượng GABA tạo ra cao hơn hẳn trong môi trường không có MSG, hàm lượng GABA ở nồng độ MSG 0,5% là 1537,8 mg/L, cao hơn 1,22 lần so với ở môi trường không bổ sung MSG.



**Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ MSG đến khả năng sinh GABA của chủng *L. pentosus* R1**

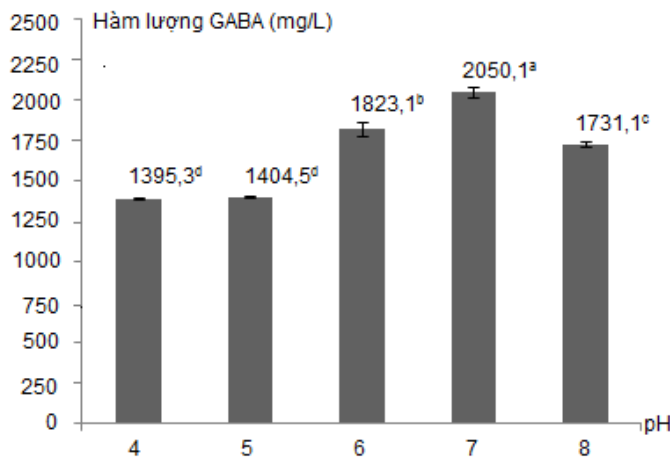
Tế bào được nuôi trong môi trường MRS với mật độ ban đầu là  $5.10^7$  CFU/mL ở 37°C trong 24 giờ. Nồng độ GABA được định lượng bằng phương pháp HPLC. Các cột không có cùng chữ cái in thường là khác nhau có nghĩa ( $p < 0,05$ ).

Trong môi trường MRS không bổ sung MSG vi sinh vật vẫn hấp thu các nguồn carbon và ni tơ hữu cơ trong môi trường và tiết ra enzyme GAD. Khi vi khuẩn hấp thụ glutamate trong MSG từ các tranposter đặc hiệu, enzyme GAD sẽ xúc tác phản ứng decarboxyl hóa glutamate trong tế bào chất, dẫn đến tiêu thụ proton trong tế bào, làm tăng độ pH của tế bào chất và pH ngoại bào do quá trình chuyển đổi glutamate thành GABA (Di Cagno *et al.*, 2010).

Ảnh hưởng của hàm lượng MSG lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *L. plantarum* K154 phân lập từ kim chi đã được Park và đồng tác giả (2014) chỉ ra, ở nồng độ MSG bổ sung tăng dần từ 1 đến 3% thì lượng GABA thu được cũng tăng theo từ 154,86 µg/ml lên 201,78 µg/ml khi nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ. Haxing và đồng tác giả (2010) khi nghiên cứu khả năng sản xuất GABA của chủng *L. brevis* NCL912 trong quá trình lên men gián đoạn cho thấy việc bổ sung MSG nồng độ 0,25 – 0,5% là phù hợp với sự tăng trưởng của vi khuẩn lactic và hiệu suất sản sinh GABA là tốt nhất. Từ thí nghiệm này cho thấy nồng độ MSG 2% là phù hợp để bổ sung vào môi trường nuôi cấy sản xuất GABA từ chủng LAB này.

**Ảnh hưởng của pH ban đầu lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *L. pentosus* R1**

pH của môi trường nuôi cấy là điều kiện quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp GABA của các chủng vi khuẩn khác nhau, làm thay đổi hoạt động của vi khuẩn và của enzyme glutamate decarboxylase (Di Cagno *et al.*, 2010). Ngoài ra, tổng hợp GABA của một số loài LAB đã được ghi nhận là rất khác nhau tùy thuộc vào giá trị pH ban đầu của môi trường nuôi cấy (Li *et al.*, 2010). Nghiên cứu này đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện pH ban đầu của môi trường đến khả năng sinh tổng hợp GABA của *L. pentosus* R1 (Hình 2).



**Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh GABA của chủng *L. pentosus* R1**

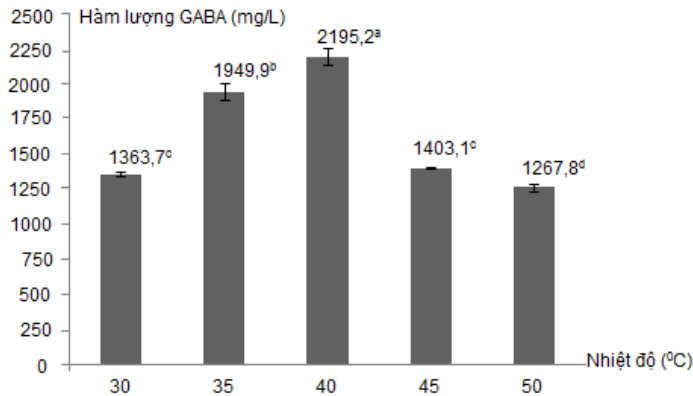
Tế bào được nuôi trong môi trường MRS với mật độ ban đầu là  $5.10^7$  CFU/mL ở 37°C trong 24 giờ. Nồng độ GABA được định lượng bằng phương pháp HPLC. Các cột không có cùng chữ cái in thường là khác nhau có nghĩa ( $p < 0,05$ ).

Hàm lượng GABA sinh ra tăng dần, tỉ lệ thuận với sự tăng dần của giá trị pH từ 4 đến 7, thấp nhất ở pH 4 và 5, đạt 1395,3 mg/L và 1404,5 mg/L (hai giá trị này không có sai khác có ý nghĩa thống kê) và cao nhất là 2050,1 mg/L ở pH bằng 7, sau đó giảm xuống. Kết quả này cho thấy pH ban đầu trung tính thuận lợi cho sự tích lũy

GABA của *L. pentosus* R1 mặc dù hoạt động của decarboxylase cao nhất ở pH 5 (Komatsuzaki *et al.*, 2005). Độ pH trong môi trường lên men thay đổi theo thời gian trong quá trình lên men. Do đó, pH ban đầu ảnh hưởng đến khả năng sinh GABA cuối cùng và độ pH của môi trường phải được điều chỉnh kịp thời để duy trì pH tối ưu (Di Cagno *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu này cũng chỉ ra ở pH kiềm tính có thể dẫn đến giảm đáng kể việc sinh tổng hợp GABA do môi trường kiềm có thể ức chế sự phát triển của tế bào.

### Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *L. pentosus* R1

Nhiệt độ nuôi cấy là một thông số quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp GABA bởi LAB vì sự phát triển và hoạt động của tế bào vi khuẩn của GAD đều phụ thuộc vào nhiệt độ (Cui *et al.*, 2020). Do đó, cần thiết phải tìm ra nhiệt độ nuôi cấy LAB tối ưu cho sự tích lũy GABA của *L. pentosus* R1 để tối ưu hóa năng suất. Ở nghiên cứu này, vi khuẩn được nuôi trong môi trường MSR trong điều kiện tối ưu về mật độ tế bào ban đầu, nồng độ MSG 2% và pH ban đầu bằng 7, hàm lượng GABA được xác định sau 24 giờ nuôi cấy (Hình 3).



**Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh GABA của chủng *L. pentosus* R1**

Tế bào được nuôi trong môi trường MRS với mật độ ban đầu là  $5.10^7$  CFU/mL ở 37°C trong 24 giờ. Nồng độ GABA được định lượng bằng phương pháp HPLC. Các cột không có cùng chữ cái in thường là khác nhau có nghĩa ( $p < 0,05$ ).

Kết quả cho thấy hàm lượng GABA trong môi trường tăng lên khi nhiệt độ tăng từ 30 đến 40°C. Mức GABA cao nhất là  $2195,2 \pm 60,4$  mg/L đạt được ở 40°C cho thấy đây là nhiệt độ tối ưu cho sinh tổng hợp GABA bởi *L. pentosus* R1. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ nuôi cấy lên 45°C, hàm lượng GABA giảm tương đối nhiều, lượng GABA thu được tương ứng với các mức nhiệt độ 45°C và 50°C là  $1403,1 \pm 3,9$  mg/L và  $1267,8 \pm 27,1$  mg/L, các con số này đều sai khác có ý nghĩa thống kê so với nhiệt độ 40°C. Điều này chứng tỏ tác động tiêu cực của nhiệt độ cao đến khả năng sản sinh GABA.

Nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp GABA là do nó tác động đến hoạt động của enzyme GAD. Theo Yang và đồng tác giả (2015), hoạt động của GAD tăng đến mức tối đa để đáp ứng với việc tăng nhiệt độ ở một mức độ nhất định, sau đó giảm dần khi nhiệt độ tăng lên. Mỗi LAB khác nhau có nhiệt độ tối thích trong sinh tổng hợp GABA có thể không giống nhau. Yang và đồng tác giả (2008) khi nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 cho thấy hàm lượng GABA đạt được cao nhất ở 40°C là  $7984,75 \pm 293,33$  mg/L. Tuy nhiên, các chủng LAB khác nhau có nhiệt độ tối thích cho việc sinh GABA khác nhau, *Lb. brevis* NCL912 phát triển và cho hàm lượng GABA cao nhất đạt 149,05 mM khi nuôi ở nhiệt độ 30°C sau 48 giờ nuôi cấy (Haixing *et al.*, 2008). Việc sinh tổng hợp GABA của chủng *L. pentosus* R1 trong thí nghiệm này cho thấy có mối quan hệ với sự biến đổi chức năng của GAD, mối tương quan này cần được nghiên cứu thêm.

### KẾT LUẬN

*L. pentosus* R1 là một LAB có khả năng sinh tổng hợp GABA trong môi trường nuôi cấy MRS. Nghiên cứu này đã cho thấy khả năng sinh GABA khác nhau ở các điều kiện nồng độ MSG, pH ban đầu và nhiệt độ nuôi cấy khác nhau. Kết quả này cung cấp những thông tin có ích trong việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy sinh GABA cao đối với chủng R1 và mở ra hướng nghiên cứu về các chủng LAB có khả năng sản sinh GABA để ứng dụng vào các thực phẩm có giá trị khác.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Banchuen J, Paiboon T, Buncha O, Phaisan W and Piyarat S (2010). Increasing the bio-active compounds contents by optimizing the germination conditions of Southern Thai Brown rice. *Songklanakarin J Sci Technol* 32 (3): 219-230.

Cui Y, Miao K, Niyaphorn S and Qu X (2020). Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *Int J Mol Sci* 21(3): 1-21.

- Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH (2012). Production of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by Microorganisms. *Bra J Microbiol* 43(4): 1230-1241.
- Di Cagno R, Mazzacane F, Rizzello C. G, De Angelis M, Giuliani G, Meloni M, Gobbetti M (2010). Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: Functional grape must beverage and dermatological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(2): 731-741.
- Haixing L, Ting Q, Dandan G, Yusheng C (2010). Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino Acids* 38: 1439-1445.
- Jin Z, Mendu S. K, Birnir B (2011). GABA is an effective immunomodulatory molecule, *Amino Acids* 45: 87-94.
- Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T (2005). Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol* 22(6): 497-504.
- Li H, Qiu T, Huang G, Cao Y (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microb Cell Fact* 9(85): 1-7.
- Lu X, Chen Z, Gu Z, Han Y (2008). Isolation of  $\gamma$ -aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochem Engin J* 41(1): 48-52.
- Park SY, Lee JW, Lim SD (2014). The Probiotic Characteristics and GABA Production of *Lactobacillus plantarum* K154 Isolated from Kimchi. *Food Sci Biotechnol* 23(6): 1951-1957.
- Syu KY, Lin CL, Huang HC, Lin JK (2008). Determination of theanine, GABA, and other amino acids in green, oolong, black, and Pu-erh teas with dabsylation and high-performance liquid chromatography. *J Agri Food Chem* 56(17): 7637-7643.
- Yang T, Rao Z, Kimani BG, Xu M, Zhang X, Yang ST (2015). Two-step production of gamma-aminobutyric acid from cassava powder using *Corynebacterium glutamicum* and *Lactobacillus plantarum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42(8): 1157-1165.

## EFFECT OF SOME FACTORS ON THE GABA PRODUCTION ABILITY OF *Lactobacillus pentosus* R1

Do Thi Bich Thuy<sup>1\*</sup>, Nguyen Thi Kim Chi<sup>2</sup>, Nguyen Thy Dan Huyen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hue University of Agriculture and Forestry, Hue University

<sup>2</sup> Department of Food safety and hygiene of Gia Lai Province

### SUMMARY

Gamma - aminobutyric acid (GABA) acts as a major neurotransmitter inhibitor in the central nervous system. This compound is synthesized by bacteria, mold and sprouting cereal grains. LAB have been considered as a safest bacteria compared with another one. This study investigated the effect of several conditions on GABA biosynthesis by *Lactobacillus pentosus* R1 strain. The GABA content was determined by HPLC method. The results showed that GABA content reached the highest when *L. pentosus* R1 strain was cultured in MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) supplemented with 2% monosodium glutamate (MSG), initial pH 7 and culture temperature was 40°C. Under optimal culture conditions, the GABA content achieved in the medium is 2195.2 ± 60.4 mg/L. The information about *L. pentosus* R1 with the ability to produce GABA is an important breakthrough for the development of functional food.

**Keywords:** GABA, *Lactobacillus pentosus* R1, MSG, temperature, pH.

\* Author for correspondence: Tel: +84-914091340; Email: dothibichthuy@huaf.edu.vn