

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sinh gamma aminobutyric acid cao từ thực phẩm lên men truyền thống

Ngô Đại Hùng¹, Trần Quốc Tuấn^{2,3}, Nguyễn Thị Nhật Hằng¹, Huỳnh Anh Tuấn¹, Võ Thị Kim Thu¹,
Nguyễn Thanh Bình¹, Ngô Đại Nghiệp^{2,3}, Võ Thanh Sang^{4*}

¹Trường Đại học Thủ Dầu Một, 06 Trần Văn On, phường Phú Hòa, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

²Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, phường Linh Trung, quận Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Viện Ứng dụng Công nghệ và Phát triển Bền vững, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, 300A Nguyễn Tất Thành, phường 13, quận 4, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/11/2021; ngày chuyển phản biện 4/11/2021; ngày nhận phản biện 23/11/2021; ngày chấp nhận đăng 26/11/2021

Tóm tắt:

Gamma aminobutyric acid (GABA) được tổng hợp bởi vi sinh vật gồm vi khuẩn, nấm men và nấm. Vi khuẩn lactic trong các sản phẩm lên men chua truyền thống ở Việt Nam có vai trò quan trọng trong chế biến và bảo quản thực phẩm. Nghiên cứu này thực hiện phân lập các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng sinh GABA cao từ thực phẩm lên men truyền thống. 8 chủng vi khuẩn BC3, BC4, BC5, BC6, BC7, K08, KC1 và KC2 được phân lập từ các nguồn thực phẩm lên men truyền thống gồm bắp cải (BC), kiệu (K) và kim chi (KC). Sau 72 giờ lên men, chủng BC3 từ BC lên men sinh GABA cao nhất (4,279 g/l) được chọn và định danh thuộc loài *Lactobacillus fermentum* dựa trên trình tự gen 16S rRNA. Kết quả khảo sát thời gian lên men và nồng độ monosodium glutamate (MSG) thích hợp cho thấy chủng BC3 sinh GABA cao nhất với giá trị là 6,734 g/l sau 72 giờ lên men và nồng độ MSG là 4%.

Từ khóa: gamma aminobutyric acid, *Lactobacillus fermentum*, sắc ký bản mỏng, thực phẩm lên men truyền thống, 16S rRNA.

Chỉ số phân loại: 1.6

1. Đặt vấn đề

GABA là một amino acid có hoạt tính sinh học với nhiều chức năng sinh lý quan trọng như chống béo phì [1], tăng khả năng miễn dịch [2], chống tăng huyết áp [3], giảm lo âu, cải thiện chứng khó ngủ [4] và chống trầm cảm [5]. GABA được sản xuất từ vi sinh vật như nấm men, nấm [6], vi khuẩn [7] với nhu cầu ngày càng tăng. Nhóm vi khuẩn lactic (*Lactobacillus* spp.) được công nhận là nhóm an toàn sinh học, đóng vai trò chủ đạo trong nhóm probiotic và có thể sản xuất được lượng lớn GABA [8]. Vi khuẩn lactic gồm các chủng *L. paracasei* PF6, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PR1, *L. lactis* PU1, *L. plantarum* C48 và *L. brevis* PM17 phân lập từ các loại phô mai khác nhau sản xuất GABA đạt lần lượt là 99,9, 63, 36, 16 và 15 mg/kg trong môi trường nuôi cấy khác nhau [9].

Ở Việt Nam, quy trình sản xuất GABA từ các chủng vi khuẩn và các môi trường khác nhau cũng đã được tiến hành nghiên cứu. Q.T. Viet và cs (2013) [10] nghiên cứu đặc điểm chủng vi khuẩn probiotic *L. brevis* NCTH24 có khả năng sinh tổng hợp GABA và khả năng ứng dụng trong biogurt. Năm 2014, T.T. Ngoan và cs [11] nghiên cứu lên men dịch chiết phôi cám gạo để làm giàu GABA bởi chủng vi khuẩn probiotic *L. plantarum* NCDC3. Cùng năm 2014, L.T.K. Tuyen và cs (2014) [12] thuộc nhóm nghiên cứu Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường

Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội đã nghiên cứu thành công quy trình sản xuất GABA bằng lên men dịch cám gạo từ *L. plantarum* để ứng dụng làm thực phẩm chức năng. Trong nghiên cứu này, GABA được sản xuất bằng chủng *Lactobacillus* sp. được phân lập và tuyển chọn từ thực phẩm lên men truyền thống Việt Nam. Đồng thời, chủng *Lactobacillus* sp. được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA và khảo sát thời gian lên men cũng như nồng độ cơ chất cảm ứng thích hợp cho khả năng tăng sinh GABA.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu thực phẩm lên men (BC, K, KC) mua ở chợ Bình Tây, TP Hồ Chí Minh. Chủng đối chứng *E. coli* được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh).

2.2. Môi trường nuôi cấy và giữ giống

Môi trường MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) gồm: glucose 20 g/l, peptone 10 g/l, cao thịt 10 g/l, cao nấm men 5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l, Tween 80 1 ml, sodium acetate 5 g/l, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{NH}_3$ 2 g/l, MnSO_4 0,05 g/l và thêm nước cất vừa đủ 1000 ml.

*Tác giả liên hệ: Email: vtsang@ntt.edu.vn

Isolation and selection of high gamma aminobutyric acid-producing *Lactobacillus* strains from traditional fermented foods

Dai Hung Ngo¹, Quoc Tuan Tran^{2,3}, Thi Nhat Hang Nguyen¹, Anh Tuan Huynh¹, Thi Kim Thu Vo¹, Thanh Binh Nguyen¹, Dai Nghiep Ngo^{2,3}, Thanh Sang Vo^{4*}

¹Thu Dau Mot University,

6 Tran Van On Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province, Vietnam

²Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City,

227 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Vietnam National University Ho Chi Minh City,

Linh Trung Ward, Thu Duc District, Ho Chi Minh City

⁴Institute of Applied Technology and Sustainable Development, Nguyen Tat Thanh University,

300A Nguyen Tat Thanh Street, Ward 13, District 4, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 1 November 2021; revised 23 November 2021; accepted 26 November 2021

Abstract:

Gamma aminobutyric acid (GABA) is produced by microorganisms such as bacteria, yeast, and fungi. Lactic acid bacteria play crucial roles in processing and preserving Vietnamese traditional fermented foods. The study aims to isolate high GABA-producing *Lactobacillus* strains from traditional fermented foods. Eight bacterial strains, including BC3, BC4, BC5, BC6, BC7, K08, KC1, and KC2, were isolated from traditional fermented food sources (cabbage, pickled scallion, and kimchi). After 72 hrs of fermentation, the BC3 strain produced the highest GABA content (4.279 g/l). This strain was identified as *Lactobacillus fermentum* by 16S rRNA analysis. The results from the investigation of the fermentation time and concentration of monosodium glutamate (MSG) showed that the BC3 strain producing the highest GABA with the value of 6.734 g/l was after 72 hrs of fermentation and the concentration of MSG 4%.

Keywords: gamma aminobutyric acid, *Lactobacillus fermentum*, thin layer chromatography, traditional fermented foods, 16S rRNA.

Classification number: 1.6

Môi trường MRS agar để giữ giống: Thành phần môi trường MRS có bổ sung thêm 25 g/l agar.

Môi trường MRS để nuôi cấy chọn lọc chủng sinh GABA cao: Thành phần môi trường MRS có bổ sung 1% MSG.

Môi trường carbonate - agar: Thành phần môi trường MRS có bổ sung 0,3% CaCO₃ và 25 g/l agar. Môi trường được hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 15 phút, để nguội chuẩn bị cho các bước khảo sát tiếp theo.

2.3. Phương pháp nuôi cấy và bảo quản giống

Phân lập: Lấy 1 ml mẫu cho vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường MRS lỏng đã được hấp khử trùng, ủ làm giàu ở 37°C trong 24 giờ. Vortex đều, lấy 1 ml dung dịch pha loãng thành các nồng độ từ 10⁻¹ đến 10⁻⁸. Lấy 100 µl dung dịch pha loãng cấy trải trên môi trường thạch MRS và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau khi ủ chọn các khuẩn lạc đơn có đặc điểm hình thái điển hình để làm thuần và chuẩn bị cho các bước khảo sát tiếp theo.

Giữ giống: Cấy ria chủng vi khuẩn thuần trên ống thạch nghiêng MRS sao cho xuất hiện khuẩn lạc rời. Khi vi khuẩn đã mọc cấy vào tủ mát ở nhiệt độ 4-6°C, sau 3 tuần cấy chuyển lại một lần. Phương pháp này có thể giữ giống trong khoảng 3-4 tháng. Để giữ giống lâu dài, chủng vi khuẩn thuần được nuôi trong 20 ml dung dịch MRS trong 24 giờ. Tiếp theo chuyển 1 ml dịch vào ống Eppendorf vô trùng và ly tâm ở 22°C, 8.000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ phần dịch nổi để thu sinh khối. Sau đó, bổ sung 1 ml glycerol 50% vào ống Eppendorf và giữ lạnh ở -80°C. Phương pháp này bảo quản được từ 6 tháng đến 2 năm.

Tăng sinh: Dùng que cấy lấy sinh khối từ ống giống cấy vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường MRS (đã hấp khử trùng), ủ ở 37°C trong 16-18 giờ. Phương pháp nuôi cấy: Pha loãng 10 lần dịch vi khuẩn đã tăng sinh. Hút 300 µl dịch pha loãng cho vào bình nuôi kỵ khí chứa 30 ml môi trường MRS đã hấp khử trùng. Nuôi cấy tĩnh sau 72 giờ ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại tế bào, thu dịch.

2.4. Khảo sát đặc điểm sinh hóa

Nhuộm gram: Dùng que cấy ria lấy một ít sinh khối từ khuẩn lạc cho lên 1 giọt nước cất trên lam kính. Trải trùng và làm khô để cố định mẫu. Nhuộm một giọt tím kết tinh lên vết bôi, đợi 1 phút sau đó rửa lại bằng nước cất. Nhỏ một giọt lugol lên vết bôi đợi 1 phút, tẩy còn và rửa lại bằng nước cất. Nhuộm safranin 1 phút rồi rửa lại bằng nước cất. Quan sát dưới kính hiển vi và ghi nhận kết quả.

Thử nghiệm catalase: Lấy một sinh khối để trên lam kính sạch, sau đó nhỏ trực tiếp vài giọt hydrogen peroxide lên sinh khối. Sau 3-4 giây nếu sinh khối sủi bọt khí thì kết quả là dương tính còn ngược lại không có bọt khí thì kết quả âm tính.

Xác định mối quan hệ với oxy và thử nghiệm tính di động: Dùng que cấy thẳng vô trùng lấy sinh khối vi sinh vật đâm thẳng vào môi trường thạch MRS. Vi khuẩn mọc được hết trên đường cấy cho thấy vi khuẩn là kỵ khí hoặc kỵ khí tùy tiện. Vi khuẩn không di động khi chỉ mọc trên đường cấy mà không lan ra ngoài.

Xác định khả năng sinh lactic acid: Cấy ria chủng vi khuẩn trên môi trường carbonate - agar. Vi khuẩn sinh lactic acid tiết ra môi trường phân giải CaCO₃ tạo vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc.

2.5. Kiểm tra khả năng sinh GABA của các chủng vi khuẩn phân lập

Xác định khả năng sinh GABA của các chủng vi khuẩn bằng cách lên men trong môi trường MRS lỏng có bổ sung 1% MSG, nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong 72 giờ. Dịch lên men được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại tế bào. Dịch ly tâm được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của GABA bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC).

2.6. Định tính GABA bằng phương pháp TLC

Bảo hòa hơi dung môi trong bình bằng cách cho một lượng dung môi sử dụng cách đáy bình 5-10 mm. Đậy kín nắp bình và để yên ở nhiệt độ phòng. Dùng micropipette hút 2 µl dịch vi khuẩn đã ly tâm, 2 µl dung dịch GABA chuẩn 0,2 g/l và 2 µl dung dịch MSG 0,2 g/l chấm vào bản sắc ký. Vết chấm cách mép dưới bản mỏng 1 cm. Các vết ở bìa cách bờ bên của bản mỏng ít nhất 1 cm. Các vết chấm phải cùng trên một đường thẳng. Đặt bản mỏng thẳng đứng trong bình sắc ký, các vết chấm phải ở trên bề mặt của lớp dung môi khai triển. Đậy kín bình và để yên ở nhiệt độ không đổi. Khi dung môi chạy trên bản mỏng cách mép trên 1 cm lấy bản mỏng ra khỏi bình, sấy khô. Cho dung dịch nhuộm Ninhydrin vào đĩa petri. Tiến hành nhuộm bản sắc ký và sấy trong vòng 10 phút để hiện vạch. Quan sát kết quả và kết luận khả năng sinh GABA.

2.7. Định lượng GABA trong dịch lên men bằng phương pháp TLC

Dùng micropipette hút 2 µl dịch lên men đã ly tâm bỏ cặn và chạy sắc ký. Sau khi sấy bản mỏng tiến hành cạo, thổi giải. Lăn lượt cho 200 µl đệm borate, 750 µl phenol 8%, 650 µl NaClO vào ống nghiệm chứa dịch GABA đã thổi giải. Đậy kín ống nghiệm và đun cách thủy trong 10 phút. Các ống nghiệm sau khi đun được làm lạnh và lắc trong 20 phút. Thêm 2 ml ethanol 60 độ và đo mật độ quang OD ở bước sóng 645 nm. Từ đó, dựa vào đường chuẩn tính được nồng độ GABA (g/l) theo công thức: $(OD_i - OD_0) \times 500 / (a \times 2)$, với OD_i là mật độ quang ở bước sóng 645 nm của mẫu; OD_0 là mật độ quang ở bước sóng 645 nm của mẫu đối chứng; a là hệ số góc của phương trình đường chuẩn; 500 là thể tích dịch GABA (µl) phản ứng khi dựng đường chuẩn; 2 là thể tích chấm sắc ký (µl) của mẫu.

2.8. Khảo sát thời gian lên men và nồng độ cơ chất cảm ứng

Khảo sát thời gian lên men: Nuôi cấy chủng vi khuẩn trong môi trường MRS lỏng có bổ sung 1% MSG trong các mốc thời gian 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 và 96 giờ. Sau mỗi mốc thời gian, tiến hành ly tâm thu dịch. Định lượng GABA tạo thành và ghi nhận thời gian thích hợp để nuôi cấy thu được nhiều GABA.

Khảo sát nồng độ cơ chất cảm ứng MSG: Nuôi cấy chủng vi khuẩn trong môi trường MRS lỏng có bổ sung MSG ở các nồng độ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 và 7% trong thời gian

lên men chọn được từ kết quả khảo sát thời gian. Sau thời gian lên men, ly tâm canh trường loại tế bào thu dịch. Định lượng GABA tạo thành và ghi nhận kết quả.

2.9. Định danh vi sinh vật bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA

Trích ly DNA vi khuẩn bằng DNA Genome Extraction Kit (Bio-basic, Canada) theo quy trình của nhà sản xuất. DNA sau khi thu nhận được tiến hành điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kích thước khi so sánh với thang chuẩn 1 kb plus (Bio-basic, Canada). DNA sau khi tách chiết được giải trình tự tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa, chuỗi nucleotide được truy cập và so sánh với dữ liệu trên NCBI bằng chương trình Blast để chọn kết quả có độ tương đồng cao nhất.

2.10. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Xử lý thống kê trên phần mềm Microsoft Excel 2016. Các số liệu được tính trung bình và sai số. Trình bày số liệu giá trị trung bình (Mean) ±SE (sai số chuẩn).

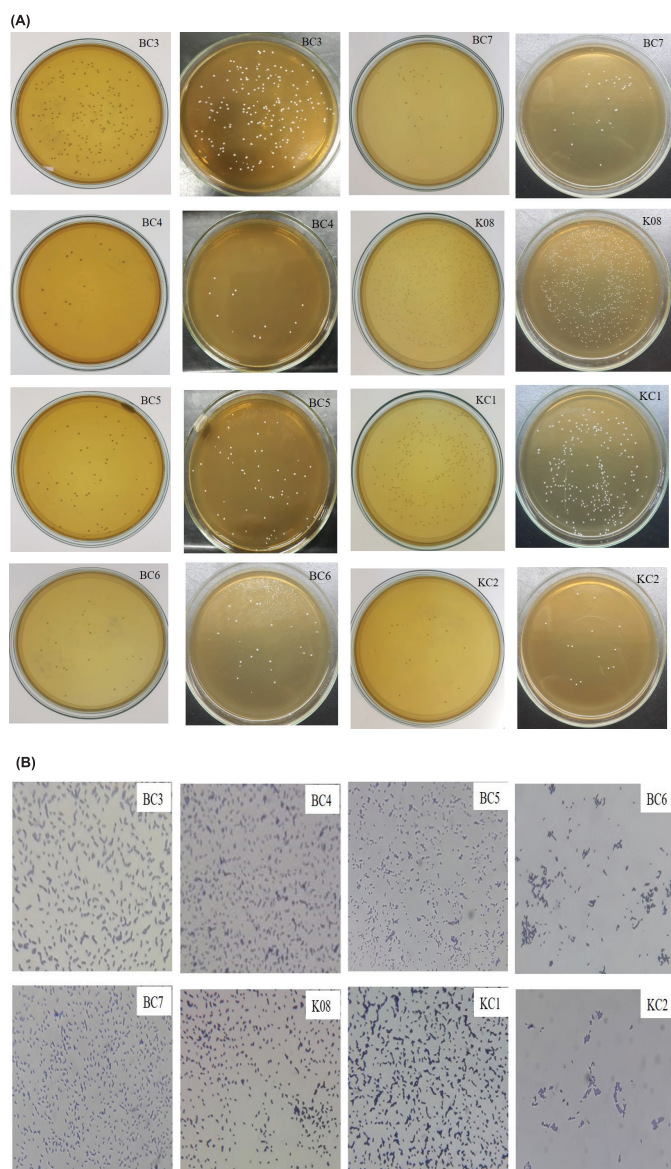
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Lactobacillus* sp.

Phân lập, làm thuần và nhuộm gram: Từ các loại thực phẩm lên men (BC, K, KC), 8 chủng vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc giống vi khuẩn sinh lactic được phân lập. Khuẩn lạc vi khuẩn sinh lactic thường nhỏ (0,5-5 mm), lồi, nhẵn, bóng, có rìa hoặc không rìa, thường đục và không sắc tố. Đặc điểm khuẩn lạc của 8 chủng vi khuẩn được mô tả ở bảng 1 và hình 1A. Đồng thời, kết quả nhuộm gram cho thấy tất cả các chủng đều có màu xanh tím, là vi khuẩn gram dương, hình que xếp thành cụm lớn, nhỏ khác nhau (hình 1B).

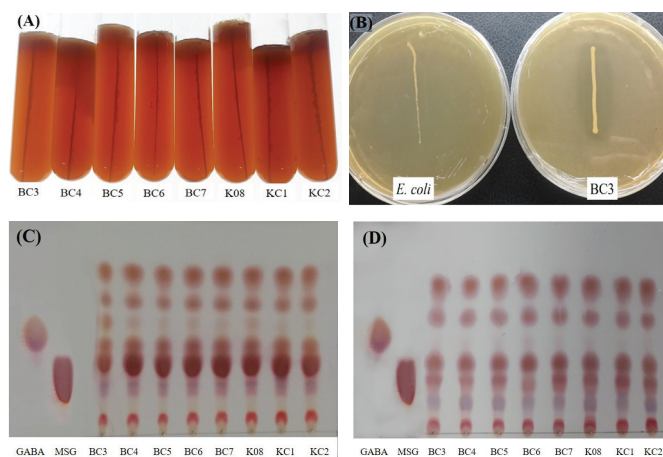
Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc các chủng vi khuẩn phân lập được từ thực phẩm lên men.

STT	Ký hiệu chủng	Nguồn phân lập	Mô tả đại thể		Đặc điểm vi thể
			Màu sắc	Hình dạng khuẩn lạc	
1	BC3	BC	Trắng đục	Khuẩn lạc to, đường kính 1-2 mm, lồi, ướt, nhô cao	Gram (+), hình que, xếp thành cụm
2	BC4	BC	Trắng đục	Khuẩn lạc có đường kính 0,5-1 mm, lồi, ướt	Gram (+), hình que, xếp thành cụm
3	BC5	BC	Trắng đục	Khuẩn lạc vừa, đường kính 0,5-2 mm, ướt	Gram (+), hình que, xếp thành cụm
4	BC6	BC	Trắng đục	Khuẩn lạc vừa, đường kính 0,5-1 mm, ướt, lồi, bóng	Gram (+), hình que, xếp thành cụm
5	BC7	BC	Trắng đục	Khuẩn lạc vừa, đường kính 0,5-1 mm, ướt, bóng	Gram (+), hình que, xếp thành cụm
6	K08	K	Trắng đục	Khuẩn lạc nhỏ, đường kính khoảng 0,5 mm, lồi, bóng	Gram (+), hình que, xếp thành cụm lớn
7	KC1	KC	Trắng đục	Khuẩn lạc vừa, có rìa nhỏ và nhẵn, không tằm, ướt, lồi, bóng	Gram (+), hình que, xếp thành cụm
8	KC2	KC	Trắng đục	Khuẩn lạc vừa, đường kính khoảng 1 mm, ướt	Gram (+), hình que, xếp thành cụm



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc các chủng phân lập (A) và kết quả nhuộm gram các chủng phân lập (B).

Kết quả thử nghiệm tính di động và thử nghiệm sinh hóa: 8 chủng vi khuẩn phân lập được cấy chìm trong môi trường MRS agar. Hình 2A cho thấy, 8 chủng vi khuẩn phân lập được không có khả năng di động, mọc dọc theo đường cấy và không lan ra môi trường xung quanh. Các phản ứng sinh hóa được thực hiện bao gồm thử nghiệm catalase, xác định khả năng tạo lactic acid trên môi trường carbonate - agar, xác định mối quan hệ với oxy. Kết quả được trình bày ở bảng 2 và hình 2B cho thấy, 8 chủng vi khuẩn phân lập được khi cấy trên môi trường MRS có bổ sung CaCO_3 đều xuất hiện vòng phân giải so với chủng đối chứng là *E. coli*, điều này cho thấy 8 chủng vi khuẩn này đều sinh được lactic acid.



Hình 2. Thử nghiệm tính di động của vi khuẩn (A), khả năng sinh lactic acid (B), định tính GABA trong dịch vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường có MSG (C) và không có MSG (D).

Bảng 2. Kết quả các thử nghiệm sinh hóa của các chủng vi khuẩn.

STT	Ký hiệu chủng	Thử nghiệm catalase	Khả năng sinh lactic acid	Mối quan hệ với oxy
1	BC3	-	+	Kỵ khí tùy tiện
2	BC4	-	+	Kỵ khí tùy tiện
3	BC5	-	+	Kỵ khí tùy tiện
4	BC6	-	+	Kỵ khí tùy tiện
5	BC7	-	+	Kỵ khí tùy tiện
6	K08	-	+	Kỵ khí tùy tiện
7	KC1	-	+	Kỵ khí tùy tiện
8	KC2	-	+	Kỵ khí tùy tiện

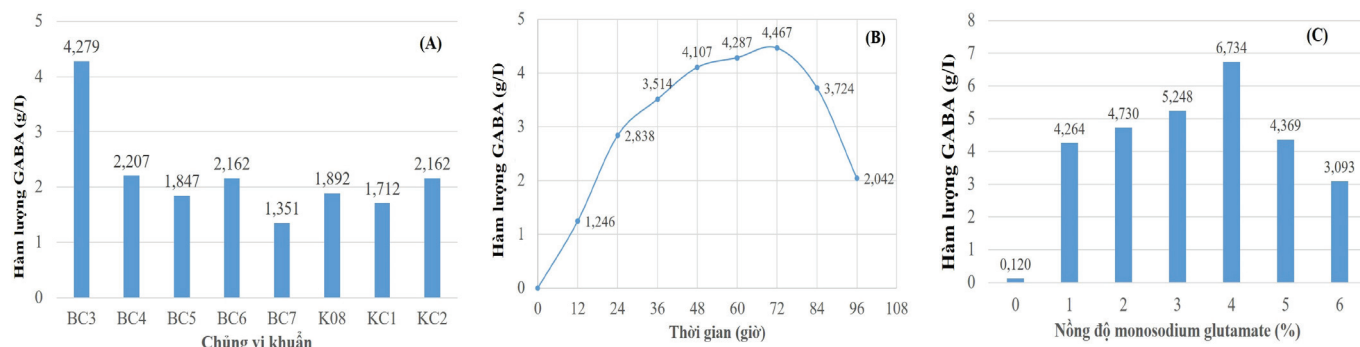
-: âm tính; +: dương tính.

3.2. Định tính GABA bằng phương pháp TLC

Kết quả định tính GABA trong dịch nuôi cấy của các chủng phân lập được sau 72 giờ nuôi cấy được thể hiện ở hình 2C và 2D. Kết quả chạy TLC dịch vi khuẩn của 8 chủng phân lập sau 72 giờ nuôi cấy trong môi trường có MSG đều xuất hiện vạch có R_f trùng với R_f của vạch GABA chuẩn. Ngược lại, trong môi trường không có MSG thì cả 8 chủng đều không xuất hiện vạch nêu trên. Điều đó cho thấy 8 chủng vi khuẩn đều sinh được GABA.

3.3. Chọn lọc chủng vi khuẩn có khả năng sinh GABA cao, khảo sát thời gian lên men và nồng độ chất cảm ứng MSG

Kết quả hình 3A và bảng 3 cho thấy, chủng BC3 có khả năng sinh GABA cao nhất (4,279 g/l) khi 8 chủng vi khuẩn phân lập sau 72 giờ nuôi cấy trong môi trường MRS có bổ sung chất cảm ứng ở cùng một mật độ tế bào ($\text{OD}_{610\text{nm}}=0,80$). Do đó, chủng BC3 được chọn để tiếp tục cho những khảo sát thời gian lên men và nồng độ chất cảm ứng MSG tiếp theo.



Hình 3. Hàm lượng GABA của các chủng vi khuẩn sau 72 giờ nuôi cấy (A), hàm lượng GABA của chủng BC3 khảo sát theo thời gian (B) và theo nồng độ MSG (C).

Bảng 3. Hàm lượng GABA của các chủng vi khuẩn sau 72 giờ nuôi cấy (A), hàm lượng GABA của chủng BC3 khảo sát theo thời gian (B) và theo nồng độ MSG (C).

Chủng vi khuẩn	0	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7	K08	KC1	KC2
Hàm lượng GABA (g/l)	0	4,279	2,207	1,847	2,162	1,351	1,892	1,712	2,162
Thời gian (giờ)	0	12	24	36	48	60	72	84	96
Hàm lượng GABA (g/l)	0	1,246	2,838	3,514	4,107	4,287	4,467	3,724	2,042
%MSG	Thử không	0	1	2	3	4	5	6	
Hàm lượng GABA (g/l)	0	0,120	4,264	4,730	5,248	6,734	4,369	3,093	

Kết quả khảo sát thời gian lên men (hình 3B và bảng 3) cho thấy, sau 72 giờ nuôi cấy chủng BC3 trong môi trường MRS có bổ sung 1% MSG thu được hàm lượng GABA cao nhất (4,467 g/l). Trong khoảng thời gian từ 12 giờ hàm lượng GABA được tạo ra rất thấp (1,246 g/l) sau đó tăng dần đến 72 giờ. Tại 72 giờ, lượng GABA được tạo ra nhiều nhất (4,467 g/l), khi thời gian tăng lên 84 và 96 giờ lượng GABA giảm.

Kết quả khảo sát nồng độ cơ chất cảm ứng MSG (hình 3C và bảng 3) cho thấy, ở nồng độ 4% chủng BC3 sinh GABA cao nhất (6,734 g/l). Trong môi trường không có MSG, chủng BC3 cũng tạo ra một lượng nhỏ GABA không đáng kể (0,120 g/l). Từ nồng độ 1-4%, lượng GABA tạo ra tăng dần và đạt cao nhất tại 4%. Ở nồng độ 5-6% lượng GABA tạo ra giảm dần.

So sánh với kết quả nghiên cứu của A.S. Espinosa và cs (2020) [13] cho thấy, hàm lượng GABA được tạo ra trong sữa sau 48 giờ lên men bởi chủng *Lactobacillus* sp. là 4,2-11,2 mg/l, thấp hơn kết quả sinh GABA của chủng BC3 (6,734 g/l). Tương tự, hàm lượng GABA cao nhất tạo ra bởi chủng *L. plantarum* NTU 102 của tác giả Y.T. Tung và cs (2011) [14] được lên men trong sữa tách béo 8%, nồng độ MSG 0,6% trong 24 giờ là 33 mg/l cũng thấp hơn GABA của chủng BC3. Sự khác biệt này có thể là do môi trường nuôi cấy, thời gian lên men khác nhau và các chủng vi khuẩn khác nhau sử dụng lượng MSG khác nhau.

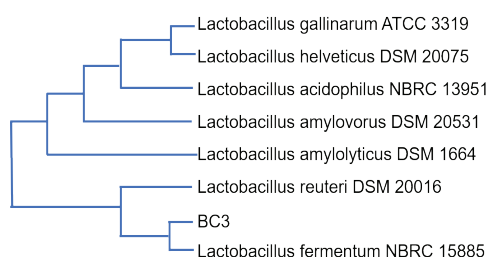
3.4. Định danh chủng *Lactobacillus* sp. BC3

Gen 16S rRNA của chủng BC3 được giải trình tự và được phân tích sử dụng chương trình Clustalw để so sánh trên GenBank. Kết quả cho thấy, chủng BC3 có độ tương đồng 100% với chủng *Lactobacillus fermentum* (MT538871.1) (hình 4). Từ kết quả này xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng BC3 (hình 5). Nghiên cứu đã phân lập thành công chủng vi khuẩn *L. fermentum* có khả năng sinh GABA cao trong 72 giờ lên men, nồng độ MSG 4% (hàm lượng GABA đạt 6,734 g/l).

So với nghiên cứu của Y. Cui và cs (2020) [15] thì hàm lượng GABA tạo ra của chủng vi khuẩn *L. bulgaricus* IAM1120 trong môi trường lên men sữa khoảng 0,015 g/l, thấp hơn hàm lượng GABA (6,734 g/l) của chủng *L. fermentum* trong nghiên cứu này. Từ đó cho thấy, khả năng sinh GABA phụ thuộc vào đặc tính của từng giống và môi trường lên men khác nhau. Đồng thời, môi trường MRS có nhiều chất dinh dưỡng phù hợp cho vi sinh vật.

KẾT QUẢ GIẢI TRÌNH TỰ
TRÌNH TỰ CHI TIẾT MẪU THỬ
>3BC CCCTAATCATCTGTGCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCTAAAGGTTACCCACCGAC TTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAAC GTATTCACCGCGGATGCTGATCCGCGATTACGACGATTCGACGCTGCGCAGG GAGTTGACGCGTGCAGTCCGAACGAGTGTAAAGAGATTGCTTGCCCTCG CGAGTTGCGGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAA GGGGCATGATGATCTGACGCTCGTCCCACTTCTCTCGGTTTGTACCGGCGAGTCT CACTAGAGTGCCCCAATTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGTTGCGCTCGTTGCG GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACTGTCA TTGCGTTCCGAAGGAAACGCCCTATCTTAGGGTTGGCGCAAGATGTCAAGACCT GGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCAATTAACACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG CCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTTCGCGTCTACTCCCAAGCGGAGTGC TTAATGCGTTAGCTCCGCGACTGAAGGCGGAAACCTCCAACACCTAGCACTCAT CGTTTACGGCATGGACTACCAAGGATATCTAATCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAG TCTCAGCGTCAGTTGACAGCCAGGTAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATAT ATCTACGCTTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTACCTCTTCTGCACTCAAGTT ATCCAGTTTCCGATGCATTTCTCCGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTGA AAACCGGCTGCACCTCTTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACTACGT ATTACCGCGCTGCTGGCAGCTAGTTAGCCGTGACTTCTGGTTAAATACCGTCAAC GTATGAACAGTTACTCTCATAGTGTCTTTTAAACACAGAGCTTTCAGAGCCGAA ACCCCTTCTCACTACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCATTGTGGAAGATT CCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTATGGGCGGTGTCTCAGTCCCAATTGTGGCCGA TCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCTTGGTAGGCCGTTACCCCAACA AGCTAATGCACCGGAGGTCCATCCGAAGTGTATAGCGAGAAAGCCATCTTTAAGCG TTGTTTCATGCGAAACAGCTTTGTTATGCGGTTATAGCATCTGTTTCCAAATGTTGCC CCGCTTCTGGCGAGGTACCTACGTGTTACTACCCGCTCCGCCACTCGTTGGCGAC CAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCTAA

Hình 4. Trình tự 16S rRNA của BC3 và kết quả tra cứu trên Blast search (NCBI).



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của chủng BC3.

4. Kết luận

Từ các sản phẩm lên men truyền thống (bắp cải, kiệu, kim chi), 8 chủng vi khuẩn có đặc tính tương tự với chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp. được phân lập và đều có khả năng sinh GABA. Trong đó, chủng BC3 lên men từ BC sinh GABA cao nhất (4,279 g/l) và được định danh là *Lactobacillus fermentum* dựa trên phân tích trình tự gen 16S sau khi so sánh với NCBI. Chủng *L. fermentum* sinh GABA cao nhất với giá trị là 6,734 g/l sau thời gian lên men thích hợp 72 giờ và nồng độ cơ chất cảm ứng MSG là 4%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 106.02-2018.304. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.H. Oh, Y.J. Moon, J.R. Soh, et al. (2005), "Effect of water extract of germinated brown rice on adiposity and obesity indices in mice fed a high fat diet", *J. Food Sci. Nutr.*, **10**(3), pp.251-256.
- [2] A.M. Abdou, S. Higashiguchi, K. Horie, et al. (2006), "Relaxation and immunity enhancement effects of gamma aminobutyric acid (GABA) administration in humans", *Biofactors*, **26**(3), pp.201-208, DOI: 10.1002/biof.5520260305.
- [3] P.M. Kat, C. Gardner-Fortier, S. Lemieux (2013), "Effect of cheese containing gamma aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria on blood pressure in men", *Pharma. Nutrition.*, **1**(6), pp.141-148, DOI: 10.1016/j.phanu.2013.06.003.
- [4] T. Okada, T. Sugishita, T. Murakami, et al. (2000), "Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness depression; autonomic disorder by oral administration", *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **47**(8), pp.596-603, DOI: 10.3136/nskkk.47.596.
- [5] H. Yang, R. Xing, S. Liu, et al. (2019), "Analysis of the protective effects of γ -aminobutyric acid during fluoride-induced hypothyroidism in male Kunming mice", *Pharm. Biol.*, **57**(5), pp.29-37, DOI: 10.1080/13880209.2018.1563621.
- [6] J.J. Wang, C. Lee, T. Pan (2003), "Improvement of monacolin K, gamma aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601", *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **30**(11), pp.669-676, DOI: 10.1007/s10295-003-0097-2.
- [7] L.A. Nguyen (2015), "Health-promoting microbes in traditional Vietnamese fermented foods: A review", *Food Sci. Hum. Well.*, **4**(4), pp.147-161, DOI: 10.1016/j.fshw.2015.08.004.
- [8] M. Diana, J. Quilez, M. Rafecas (2014), "Gamma aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review", *J. Funct. Foods*, **10**, pp.407-420, DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.004.
- [9] S. Siragusa, M.D. Angelis, R.D. Cagno, et al. (2007), "Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses", *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**(22), pp.7283-7290, DOI: 10.1128/AEM.01064-07.
- [10] Q.T. Viet, D.M. Khai, D.T. Huong, et al. (2013), "Research on characteristics of probiotic bacteria strain *Lactobacillus brevis* NCTH24 with the ability to synthesize gamma aminobutyric acid and its application in biogurt", *National Biotechnology Conference*, pp.649-653 (in Vietnamese).
- [11] T.T. Ngoan, Q.T. Viet, N.L. Anh (2014), "Research on fermentation of rice bran embryo extract to enrich gamma aminobutyric acid by probiotic bacteria strain *Lactobacillus plantarum* NCDC3", *Journal of Science and Technology*, **52**(5C), pp.154-158 (in Vietnamese).
- [12] L.T.K. Tuyen (2014), *Research on The Production Process of Γ -Aminobutyric Acid (GABA) from Rice Bran Fluid Using Lactobacillus*, Master of Science Thesis, Vietnam National University, Hanoi (in Vietnamese).
- [13] A.S. Espinosa, L.M.B. Barrientos, R.R. Díaz, et al. (2020), "Gamma aminobutyric acid (GABA) production in milk fermented by specific wild lactic acid bacteria strains isolated from artisanal Mexican cheeses", *Ann. Microbiol.*, **70**(12), pp.1-11.
- [14] Y.T. Tung, B.H. Lee, C.F. Liu, et al. (2011), "Optimization of culture condition for ACEI and GABA production by lactic acid bacteria", *J. Food Sci.*, **76**(9), pp.585-591, DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02379.x.
- [15] Y. Cui, K. Miao, S. Niyaphorn, et al. (2020), "Production of gamma aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review", *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(3), pp.1-2.