

# ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY LÊN KHẢ NĂNG SINH GABA CỦA CHỦNG VI KHUẨN LACTIC ĐÃ ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ MẮM RÒ

Lê Thị Huyền Trang, Đỗ Thị Bích Thủy\*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

## 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. Mắm rò là một loại sản phẩm thực phẩm lên men từ cá rô có bổ sung 5% muối. Trong quá trình lên men, bên cạnh protein cá được thủy phân bởi hệ enzyme protease ngoại bào của vi sinh vật có trong ruột cá còn có quá trình lên men lactic bởi hệ vi khuẩn lactic. Nghiên cứu này đã khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy (hàm lượng monosodium glutamate (MSG) bổ sung, pH ban đầu, nhiệt độ nuôi cấy) lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *Lactobacillus farciminis* M23 được phân lập từ mắm rò. Hàm lượng GABA trong các mẫu thí nghiệm được xác định bằng phương pháp HPLC. Kết quả cho thấy khi nuôi cấy chủng này trong MRS có bổ sung 1% MSG, pH ban đầu 7 ở 45°C, hàm lượng GABA đạt cao nhất. Hàm lượng GABA đạt được trong môi trường khi nuôi cấy *Lactobacillus farciminis* M23 trong điều kiện tối ưu đó là 2116,69 mg/L. Thông tin về điều kiện tối ưu để *Lactobacillus farciminis* M23 có khả năng sản sinh GABA là một bước đột phá quan trọng cho sự phát triển các loại thực phẩm chức năng.

*Từ khóa:* Gamma - aminobutyric acid (GABA), *Lactobacillus farciminis*, lên men, monosodium glutamate (MSG), thực phẩm chức năng.

## MỞ ĐẦU

GABA (Gamma - aminobutyric acid) là một amino acid có tác dụng 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). Chính vì những tác dụng quan trọng đó, gần đây, các nhà nghiên cứu trong nước cũng như trên thế giới đã và đang nỗ lực làm giàu hàm lượng hợp chất này trong các sản phẩm thực phẩm. Trong đó, hầu như các nghiên cứu tập trung về sinh tổng hợp GABA từ vi sinh vật do chu trình phát triển ngắn, quá trình nuôi cấy dễ điều khiển, môi trường nuôi cấy rẻ tiền và dễ kiếm. *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 (Dhakal *et al.*, 2012). Trong khi đó, 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, LAB còn có nhiều tính chất có lợi cho sức khỏe như 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.... Hơn nữa, vi khuẩn lactic đã được ứng dụng để lên men và thu được hàm lượng lớn GABA. 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).

Mắm rò, một loại thực phẩm lên men từ cá có hệ vi khuẩn lactic khá phong phú và đa dạng. Với mục đích cung cấp một phần thông tin về khả năng sinh tổng hợp GABA của LAB được phân lập từ sản phẩm này, trong công trình này, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy như thành phần môi trường, pH ban đầu và nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng LAB đã được phân lập từ rốc Huế.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chủng *Lactobacillus farciminis* M23 được phân lập từ mắm rò và được lưu giữ tại Phòng Thí nghiệm Vi sinh, Khoa Cơ khí - Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

**Phương pháp**

**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 (Hermle Labortechnik 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 điều kiện nuôi cấy khả năng sinh GABA của *Lactobacillus farciminis* M23 (Lu *et al.*, 2008)**

Các điều kiện nuôi cấy 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. Khi khảo sát ảnh hưởng của một yếu tố thì các yếu tố còn lại được cố định.

**Phương pháp xử lý số liệu**

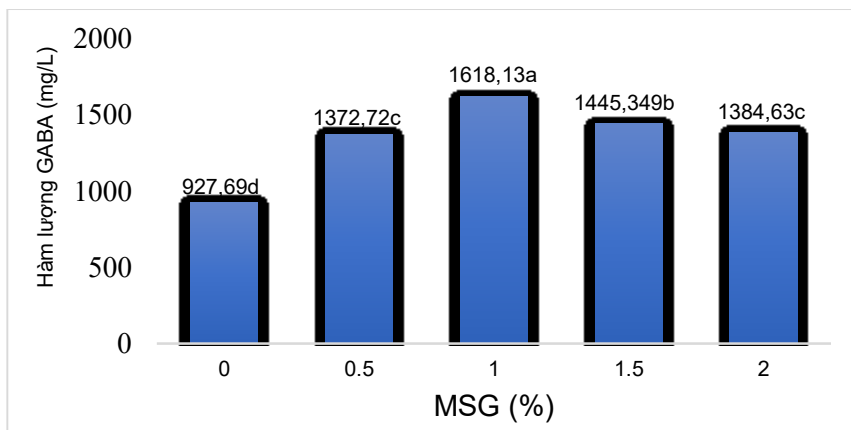
Số liệu được xử lý thống kê ANOVA trên phần mềm SPSS 2.0. Sai khác thống kê giữa các trung bình của 3 lần lặp lại được xác định bằng Duncan's test.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Ảnh hưởng của hàm lượng MSG bổ sung lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *L. farciminis* M23**

Monosodium glutamate (MSG) được xem như một nguồn cơ chất chính cho quá trình sinh tổng hợp GABA bởi 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. Vì vậy, nghiên cứu này xác định hàm lượng MSG được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *L. farciminis* M23 cho khả năng sinh GABA cao nhất.

Kết quả (Hình 1) cho thấy khi bổ sung vào môi trường MRS 1% MSG hàm lượng GABA tích lũy trong môi trường là cao nhất (1618,13 mg/mL). Bổ sung MSG vào môi trường cao hơn 1% cho hàm lượng GABA tích lũy thấp hơn có thể do ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu.

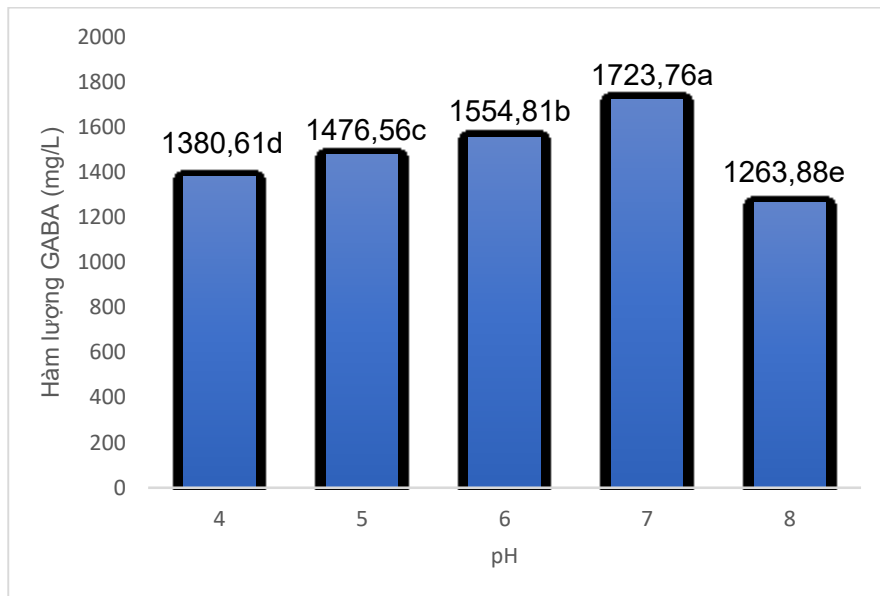


**Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ MSG đến khả năng sinh GABA của chủng *L. farciminis* M23**  
 Tế bào được nuôi trong môi trường MRS với mật độ ban đầu là  $5.10^6$  CFU/mL ở 37°C trong 24 giờ. Nồng độ GABA được định lượng bằng phương pháp HPLC. Các cột không có cùng chữ cái in thường là khác nhau có nghĩa ( $p < 0,05$ ).

Park và đồng tác giả (2014) đã nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng MSG lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *L. plantarum* K154 phân lập từ kim chi. Nhóm tác giả này công bố rằng ở nồng độ MSG bổ sung tăng dần từ 1 đến 3% thì lượng GABA thu được cũng tăng theo từ 154,86  $\mu\text{g/ml}$  lên 201,78  $\mu\text{g/ml}$  khi nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ. Trong quá trình lên men gián đoạn với tác nhân vi sinh vật là *L. brevis* NCL912 cho thấy việc bổ sung MSG nồng độ 0,25 - 0,5 M là phù hợp với sự tăng trưởng của vi khuẩn lactic và hiệu suất sản sinh GABA là tốt nhất (Haxing *et al.*, 2010).

### Ảnh hưởng của pH ban đầu lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *L. farciminis* M23

Một trong những điều kiện quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp GABA của LAB là pH ban đầu môi trường. pH ban đầu khác nhau sẽ làm thay đổi hoạt động của vi khuẩn và của enzyme glutamate decarboxylase (Di Cagno *et al.*, 2010). Khả năng sinh tổng hợp GABA của một số loài LAB đã được công bố là rất khác nhau tùy thuộc vào giá trị pH ban đầu của môi trường nuôi cấy (Li *et al.*, 2010). Vì vậy, trong công trình này điều kiện pH ban đầu của môi trường đến khả năng sinh tổng hợp GABA của *L. farciminis* M23 đã được khảo sát (Hình 2). Kết quả cho thấy rằng giá trị thích hợp nhất cho chủng này sinh tổng hợp GABA cao nhất (1723,76 mg/L) là pH 7. Khi pH tăng lên đến pH 8 hàm lượng GABA tích lũy được trong môi trường giảm hẳn (1263,88 mg/L). Kết quả này cho thấy pH ban đầu trung tính thuận lợi cho sự tích lũy GABA của *L. farciminis* M23. Hoạt động của decarboxylase cao nhất ở pH 5 (Komatsuzaki *et al.*, 2005). Như vậy, độ pH ban đầu là trung tính và sẽ giảm dần trong môi trường lên men theo thời gian trong quá trình lên men do tạo ra axit lactic. 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 điều chỉnh giảm đáng kể việc sinh tổng hợp GABA do môi trường kiềm (pH 8) có thể ức chế sự phát triển của tế bào.



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh GABA của chủng *L. farciminis* M23.

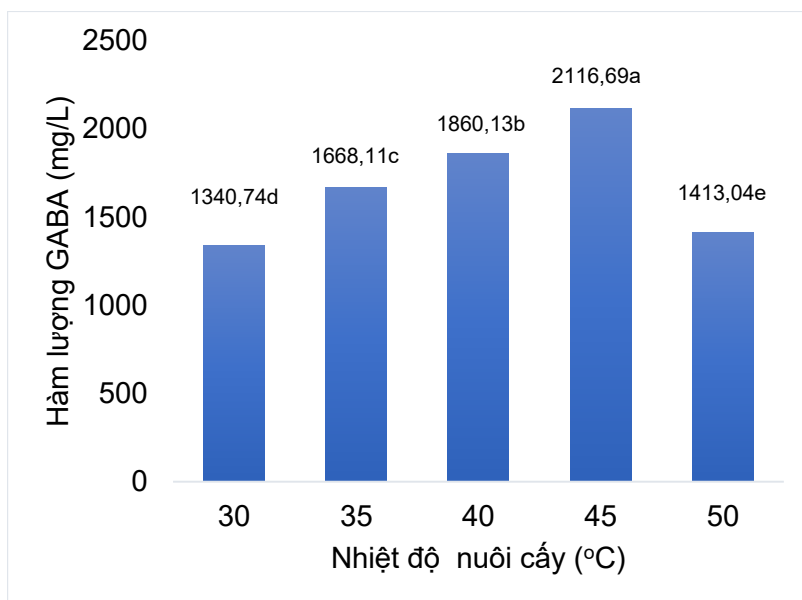
Tế bào được nuôi trong môi trường MRS bổ sung 1% MSG với mật độ ban đầu là  $5.10^6$  CFU/mL ở 37°C trong 24 giờ. Nồng độ GABA được định lượng bằng phương pháp HPLC. Các cột không có cùng chữ cái in thường là khác nhau có nghĩa ( $p < 0,05$ ).

### Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *L. farciminis* M23

Sự phát triển và hoạt động của tế bào vi khuẩn lactic cũng như enzyme GAD đều phụ thuộc vào nhiệt độ (Cui *et al.*, 2020). Vì vậy, nhiệt độ nuôi cấy là một thông số quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp GABA bởi LAB. Cho nên việc nghiên cứu để xác định nhiệt độ nuôi cấy tối ưu cho sự tích lũy GABA của *L. farciminis* M23 là hết sức cần thiết. Ở nghiên cứu này, chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường MRS trong điều kiện tối ưu về mật độ tế bào ban đầu  $5.10^6$  CFU/mL, bổ sung 1% MSG và pH ban đầu 7, hàm lượng GABA trong các mẫu thí nghiệm được nuôi cấy ở các mức nhiệt độ khác nhau được xác định sau 24 giờ nuôi cấy (Hình 3). Kết quả cho thấy khi nhiệt độ nuôi cấy tăng từ 30 đến 45°C, hàm lượng GABA tăng lên. Hàm lượng GABA đạt được khi nuôi cấy ở 45°C là cao nhất (2116,69 mg/L). Ở nhiệt độ nuôi cấy cao hơn (50°C), hàm lượng GABA giảm hẳn (1413,04 mg/L) và có sai khác có ý nghĩa thống kê so với nhiệt độ 45°C.

Nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp GABA là do nó tác động đến hoạt động của enzyme GAD. 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 (Yang *et al.*, 2015). 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 mg/L. Trong khi đó, chủng *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).



**Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh GABA của chủng *L. farciminis* M2**  
 Tế bào được nuôi trong môi trường MRS với mật độ ban đầu là  $5.10^6$  CFU/mL, bổ sung 1% MSG, pH ban đầu 7 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 LUẬN

Chủng *L. farciminis* M23 là một LAB có khả năng sinh tổng hợp GABA khá cao trong môi trường nuôi cấy MRS. Khi được nuôi cấy trong điều kiện môi trường MRS có bổ sung 1% MSG, pH ban đầu 7, nhiệt độ 45°C, chủng này cho hàm lượng GABA là 2116,69 mg/L. Kết quả này làm tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng sử dụng chủng này để lên men sản xuất chế phẩm GABA hoặc các sản phẩm thực phẩm chức năng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cui Y, Miao K, Niyaphorn S, 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. *Braz J Microbiol* 43(4): 1230-1241.
- Di Cagno R, Mazzacane F, Rizzello CG, 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 SK, 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. *Microbial Cell Factories* 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 Agricult 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 CULTURAL CONDITIONS ON GABA PRODUCTION OF LACTIC ACID BACTERIAL STRAIN ISOLATED FROM “MAM RO”

Le Thi Huyen Trang, Do Thi Bich Thuy\*

University of Agriculture and Forestry, Hue University

### SUMMARY

Gamma - aminobutyric acid (GABA) acts as a major neurotransmitter inhibitor in the central nervous system. This compound can be synthesized by bacteria, mold or from sprouting cereal grains. Among the groups of microorganisms capable of biosynthesis of GABA, lactic acid bacteria (LAB) is considered the safest bacterial group. ‘Mam ro’ is a fermented food from ‘ca ro’, a type of small fish. During fermentation fish protein was hydrolyzed by extracellular protease of fish gut together with lactic fermentation by lactic acid bacteria. This study investigated the effects of some culture conditions including monosodium glutamate (MSG) supplemented, initial pH, culture temperature on GABA biosynthesis by *Lactobacillus farciminis* M23 isolated from “mam ro”. The GABA content in the samples was determined by HPLC method. The results showed that when this strain was cultured in MRS broth supplemented with 1% of MSG, initial pH 7 at 45°C, the highest GABA content was obtained. The GABA content produced by *Lactobacillus farciminis* M23 under optimal conditions was 2116.69 mg/L. Information on the optimal conditions for *Lactobacillus farciminis* M23 to be able to produce GABA is an important breakthrough for the development of functional foods.

**Keywords:** Gamma - aminobutyric acid (GABA), fermentation, functional food, *Lactobacillus farciminis*, monosodium glutamate (MSG).

---

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