



ẢNH HƯỞNG CỦA SỰ THAY THẾ NGUỒN NGUYÊN LIỆU TỰ NHIÊN VÀ MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID CỦA CHỦNG *Pediococcus acidilactici* TC7

Trần Thanh Quỳnh Anh*, Đỗ Thị Bích Thuý

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Trần Thanh Quỳnh Anh <ttqanh@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 9-7-2023; Ngày chấp nhận đăng: 14-9-2023)

Tóm tắt. Gamma-aminobutyric acid (GABA), chất ức chế dẫn truyền thần kinh, được vi khuẩn lactic (LAB), nhóm vi khuẩn được cho là có tính an toàn nhất trong thực phẩm và dinh dưỡng, sinh tổng hợp. Với mục đích làm giảm chi phí sản xuất GABA, chúng tôi nghiên cứu việc thay thế một số nguyên liệu tự nhiên và điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *Pediococcus acidilactici* TC7. Hàm lượng GABA trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả cho thấy hàm lượng GABA đạt cao nhất ($30,784 \pm 0,104$ mM) khi chủng *Pediococcus acidilactici* TC7 được nuôi cấy trong môi trường các điều kiện thích hợp. Theo đó, môi trường thích hợp là MRS, bổ sung 50 mL dịch thanh long đỏ và 50 mL dịch sữa bò; pH ban đầu của dịch môi trường là 6; quá trình lên men sinh GABA được thực hiện ở 40 °C trong 72 giờ.

Từ khoá: gamma-aminobutyric acid, *Pediococcus acidilactici* TC7, quá trình lên men, nguyên liệu tự nhiên, điều kiện nuôi cấy

Effect of the replacement of natural material and some factors on gamma-aminobutyric acid biosynthesis with *Pediococcus aci- lactici* TC7 strain

Tran Thanh Quynh Anh*, Do Thi Bich Thuy

University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Tran Thanh Quynh Anh <ttqanh@hueuni.edu.vn>

(Submitted: July 9, 2023; Accepted: September 14, 2023)

Abstract. Gamma-aminobutyric acid (GABA), an inhibitor of neurotransmitters, is biosynthesized by lactic acid bacteria (LAB), a group of bacteria believed to be the safest in food and nutrition. With the aim of

reducing the cost of GABA production, we used some natural materials and changed the culture conditions affecting the biosynthesis of GABA with the *Pediococcus acidilactici* TC7 strain. The GABA content in the culture medium was determined by using high-performance liquid chromatography (HPLC). The results show that the GABA content reached its highest value of 30.784 ± 0.104 mM when the *Pediococcus acidilactici* TC7 strain was cultured in the medium under suitable conditions. Accordingly, the medium is MRS supplemented with 50 mL of red dragon fruit juice and 50 mL of cow's milk solution; the initial pH of the medium is 6, and the GABA-producing fermentation is carried out at 40 °C for 72 hours.

Keywords: gamma-aminobutyric acid, *Pediococcus acidilactici* TC7, natural material, fermentation, culture condition

1 Đặt vấn đề

Việc sử dụng LAB làm giống khởi động cho quá trình lên men thực phẩm đã trở nên phổ biến. Chúng có thể sinh ra lactic acid trong môi trường nên có tác dụng bảo quản và tạo hương vị dễ chịu cho sản phẩm [1]. Hơn nữa, LAB thường được sử dụng để sản xuất thực phẩm chức năng do chúng có tiềm năng probiotic cũng như tạo ra môi trường lên men có chứa vitamin (ví dụ: thiamine, nicotin, acid folic, pyridoxine và vitamin B12), amino acid, exopolysaccharide và acid béo mạch ngắn (short-chain fatty acid, SCFA) [2, 3]. Bên cạnh đó, LAB có thể sinh tổng hợp GABA [4, 5], chất ức chế dẫn truyền thần kinh, hạ huyết áp, lợi tiểu, an thần, tăng cường khả năng miễn dịch, điều trị chứng khó ngủ, trầm cảm [6, 7]. Vì thế, hợp chất này là một trong những thành phần có hoạt tính sinh học được sử dụng phổ biến nhất trong thực phẩm lên men [8]. GABA có thể được sinh tổng hợp bởi động vật, thực vật và vi sinh vật. Việc sản xuất GABA của LAB đặc biệt được quan tâm do tính an toàn và chi phí sản xuất thấp.

Khả năng sinh tổng hợp GABA của LAB phụ thuộc vào tính đặc hiệu và hoạt động của các enzyme nội bào khác nhau bao gồm enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD) [9]. Hệ thống enzyme nội bào phức tạp này dẫn đến hoạt động sinh tổng hợp GABA có sự khác nhau trong mỗi chủng vi sinh vật phụ thuộc vào các điều kiện nuôi cấy [10]. Do đó, việc nghiên cứu xác định các điều kiện nuôi cấy là vô cùng quan trọng để thu được hàm lượng GABA cao trong môi trường.

Trong nghiên cứu trước đây, điều kiện thích hợp để chủng *Pediococcus acidilactici* TC7 sinh tổng hợp GABA cao là mật độ tế bào ban đầu 10^7 CFU/mL, môi trường MRS bao gồm: pepton (10 g), beef extract (10 g), yeast extract (5 g), glucose (20 g), sorbitan monooleate (Tween 80) (1 g), di-potassium hydrogen orthophosphate (2 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0,05 g), ammonium citrate (2 g), sodium acetate-3H₂O (5 g), nước cất (đủ 1 lít), pH 6,2 [18, 11] có bổ sung 1,5% monosodium glutamate (MSG), 2% saccharose, 2% peptone [12]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm thay thế hàm lượng saccharose bổ sung trong môi trường thích hợp bởi một số dịch trái cây có chứa hàm lượng saccharose cao như dịch thanh long đỏ [13], dịch dưa hấu [14] và dịch dứa [15]. Đồng thời hàm lượng peptone bổ sung được thay thế bằng các nguồn giàu

protein như sữa bò [16] và sữa đậu nành [17]. Mục đích của việc thay thế này là làm giảm chi phí môi trường nuôi cấy từ đó tăng hiệu quả kinh tế.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Chủng *Pediococcus acidilactici* TC7 được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Vi sinh Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế. Chủng này có khả năng sinh tổng hợp GABA cao so với các chủng đã khảo sát [12].

Thanh long đỏ, dưa hấu, dưa (mua trên thị trường của thành phố Huế), sữa tươi TH, sữa đậu nành Vinamilk. Dịch trái cây thu được sau khi ép trên máy Kangaroo KG1B6. Dựa vào hàm lượng đường khác nhau của mỗi loại trái cây khác nhau để tính thể tích thay thế.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh tổng hợp GABA của vi khuẩn lactic

Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đối với quá trình sinh tổng hợp GABA cao của chủng LAB được thực hiện tuần tự theo từng yếu tố một, có nghĩa là khi thực hiện thay đổi yếu tố này thì các yếu tố khác được cố định. Bố trí thí nghiệm thay thế hàm lượng saccharose và peptone bổ sung tương ứng với hàm lượng trong dịch ép trái cây và dịch sữa được thể hiện trên Bảng 1.

Các dịch ép bao gồm thanh long đỏ, dưa hấu và dưa có hàm lượng đường khác nhau tùy vào mỗi loại trái cây. Các điều kiện nuôi cấy được khảo sát ở các mức như sau: pH ban đầu (4, 5, 6, 7 và 8), nhiệt độ nuôi cấy (30, 35, 40, 45 và 50 °C) và thời gian nuôi cấy (0, 24, 48, 72, 96 và 120 giờ). Hàm lượng GABA trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng phương pháp HPLC [18].

Bảng 1. Thay thế hàm lượng saccharose và peptone bổ sung bởi dịch trái cây và dịch sữa

Nguyên liệu bổ sung	Hàm lượng đường (trong dịch trái cây) và protein (trong dịch sữa) (%)	Thể tích dịch thay thế saccharose và peptone bổ sung (mL/100 mL môi trường)
Dịch dưa hấu	6	33
Dịch thanh Long đỏ	4	50
Dịch dưa	10	20
Dịch sữa bò	4	50
Dịch sữa đậu nành	4	50

Phân tích hàm lượng GABA

Dịch nổi thu được từ dịch nuôi cấy sau khi ly tâm (12.000 vòng/phút, 4 °C, 5 phút) được pha loãng 10 lần với nước khử ion để chuẩn bị phân tích. Các protein hòa tan được loại bỏ khỏi phần nổi phía trên bằng cách thêm 1 mL axit sulfo-salicylic 3% và ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 5 phút. Việc tạo dẫn xuất của GABA được thực hiện theo mô tả của Syu và cs. [18]. GABA trong phần nổi phía trên được tạo dẫn xuất bằng cách dabsyl hóa với 4 mM 4-dimethylaminoazobenzen-4-sulfonyl chloride ở 70 °C trong 20 phút. Sau đó, 0,5 mL ethanol được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Phản ứng được kết thúc bằng cách ủ trong bể nước đá. Dung dịch dabsyl-GABA được ly tâm ở tốc độ 16.000 vòng/phút ở 4 °C trong 5 phút và lọc qua màng 0,22 µm trước khi phân tích trên HPLC. GABA tinh khiết (của hãng Sigma) được sử dụng làm chất chuẩn. Hệ thống HPLC để định lượng dabsyl-GABA bao gồm bơm phân phối dung môi Shimadzu LC-20A (Shimadzu, Nhật Bản), cột Supelco C18 (đường kính trong 250 m × 4,6 mm, kích thước hạt 5 µm) và đèn UV Shimadzu SPD-20A Detector UV- Vis đặt ở bước sóng 465 nm. Pha động là dung dịch đệm ammonium acetate 25 mM chứa 0,1% acetic acid/acetonitril (26/74 (v/v)). Phép phân tích được thực hiện với chế độ rửa giải có tốc độ dòng 1 mL/phút. Cột được duy trì ở nhiệt độ 55 °C.

Xác định mật độ tế bào

Mật độ tế bào trong huyền phù sinh khối được xác định bằng phương pháp đo độ đục (đo mật độ quang (OD)) ở bước sóng 600 nm. OD = 1 tương đương với 8.10^8 CFU/mL. Từ đó tính toán lượng tế bào tiếp giống vào môi trường nuôi cấy [19].

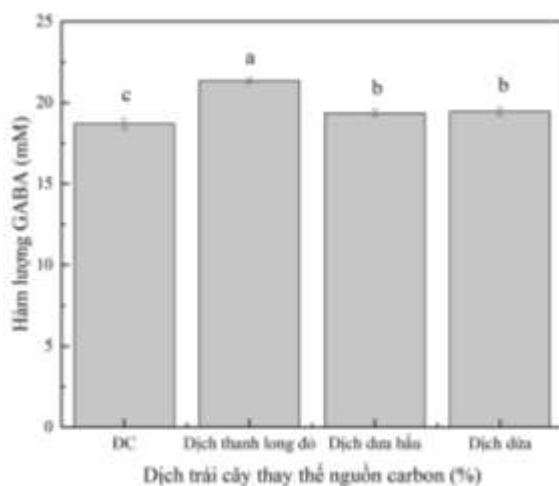
Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và 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. Giá trị độ lệch chuẩn (SD) giữa 3 thí nghiệm lặp lại cũng được tính toán trên phần mềm này.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của việc thay thế saccharose bởi dịch trái cây lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Kết quả (Hình 1) cho thấy sự thay thế đường bởi các loại dịch trái cây khác nhau (dịch thanh long đỏ, dịch dưa hấu và dịch dứa) bổ sung vào môi trường MRS đều làm cho hàm lượng GABA tăng. Sự tăng này là không giống nhau và sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm đều có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Sự khác nhau này có lẽ là do thành phần vitamin và khoáng chất trong các loại dịch trái cây khác nhau là không giống nhau [13–15]. Trong đó, hàm lượng GABA sinh ra bởi *P. acidilactici* TC7 đạt giá trị cao nhất là $21,361 \pm 0,145$ mM khi ta bổ sung vào môi trường nuôi cấy dịch thanh long đỏ. Với thí nghiệm có bổ sung dịch dưa hấu và dịch dứa thì



Hình 1. Ảnh hưởng của việc thay thế saccharose bởi dịch trái cây lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

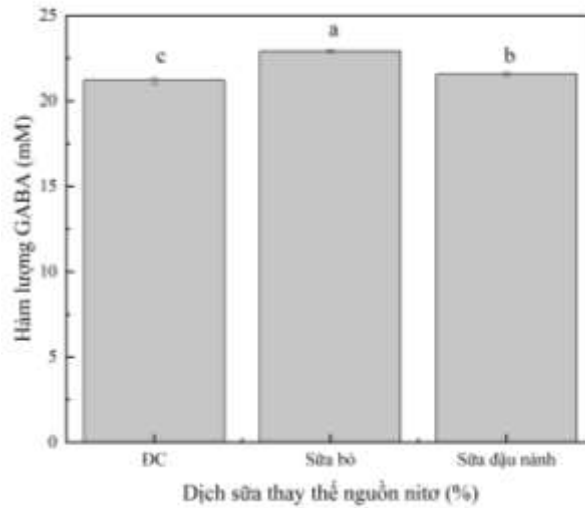
Ghi chú: Các tế bào được nuôi trong môi trường MRS và 1,5% MSG, 2% pepton, các loại dịch trái cây khác nhau (50 mL dịch thanh long đỏ, 33 mL dịch dưa hấu, 20 mL dịch dưa), mật độ ban đầu là 10^7 CFU/mL ở 37 °C trong 24 giờ). Mẫu đối chứng (ĐC) là môi trường nuôi cấy không thay thế dịch trái cây. Các chữ cái in thường không giống nhau thể hiện sự khác nhau có nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

hàm lượng GABA thu được là thấp hơn, lần lượt là $19,362 \pm 0,195$ mM và $19,452 \pm 0,235$ mM. Đã có nhiều nghiên cứu trước đây về vấn đề này và cũng cho kết quả tương tự như là Kim và cs. [20] đã cho rằng nước quả mâm xôi đen thích hợp để chủng *L. brevis* GABA100 tạo ra hàm lượng GABA tối đa ($26,5 \pm 2,8$ mg/mL) ở độ pH ban đầu là 5,5. *Lactococcus lactis* và *Lactobacillus rhamnosus* được nuôi cấy trong môi trường dịch đậu đỏ lên men sẽ có khả năng sinh tổng hợp GABA với hàm lượng cao. Điều kiện lên men ở 30 °C trong 24 giờ, mật độ tế bào ban đầu là 10^8 CFU/mL, bổ sung vào môi trường lên men 4% sucrose và 4% chiết xuất nấm men thì lượng GABA thu được đạt cực đại (49,44 mg/100 mL) [21].

Từ kết quả của nghiên cứu này, chúng tôi chọn thay thế hàm lượng saccharose bổ sung vào môi trường thích hợp là dịch thanh long đỏ (50 mL/100 mL môi trường) để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.2 Ảnh hưởng của việc thay thế peptone bằng dịch sữa lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Từ đồ thị (Hình 2) ta thấy rằng thay thế peptone bởi các dịch sữa khác nhau, hàm lượng GABA trong môi trường cao hơn so với mẫu đối chứng. Trong đó, hàm lượng GABA thu được cao hơn ($22,921 \pm 0,103$ mM) khi trong môi trường có sữa bò so với sữa đậu nành với giá trị



Hình 2. Ảnh hưởng của việc thay thế peptone trong môi trường nuôi cấy bằng dịch sữa bò và sữa đậu nành lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Ghi chú: Các tế bào được nuôi trong môi trường MRS và 1,5% MSG, 50 mL dịch thanh long đỏ, các loại dịch sữa khác nhau (50 mL dịch sữa bò, 50 mL dịch sữa đậu nành), mật độ ban đầu là 10^7 CFU/mL ở 37 °C trong 24 giờ. Mẫu đối chứng (ĐC) là môi trường không thay thế dịch sữa. Các chữ cái in thường không giống nhau thể hiện sự khác nhau có nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

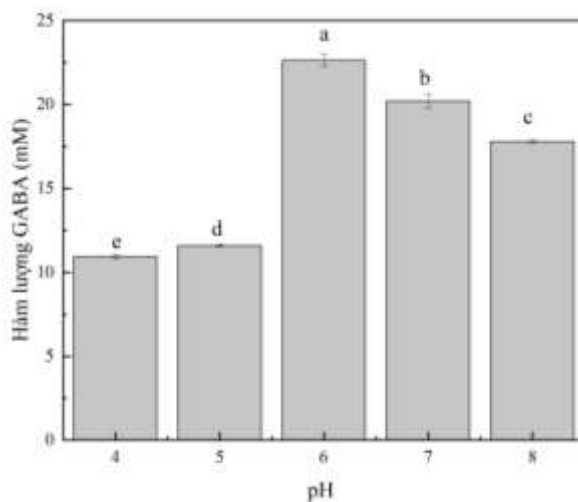
GABA (21,566 ± 0,137 mM). Điều đó có lẽ do thành phần dinh dưỡng của sữa bò phù hợp với khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng khảo sát hơn so với sữa đậu nành [16, 17].

Việc sử dụng protein đậu nành trong quá trình lên men sinh tổng hợp GABA cũng được thực hiện bởi *Lactobacillus brevis* bởi Zareie và cs. [22]. Kết quả cho thấy rằng các điều kiện tối ưu để hàm lượng GABA sinh ra cao nhất (1473,44 ppm) bao gồm 5% protein đậu nành, 3% inulin và thời gian lên men 96 giờ ở 37 °C.

Từ đó, dịch sữa bò được lựa chọn để thay thế cho lượng peptone trong môi trường nuôi cấy cho các thí nghiệm tiếp theo. Hàm lượng dịch sữa bò thích hợp là 50 mL/100 mL môi trường.

3.3 Ảnh hưởng của pH ban đầu lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7

Độ pH của môi trường nuôi cấy là một yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp GABA của LAB vì nó không chỉ ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn mà còn ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme GAD [7]. Do đó, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của độ pH ban đầu đối với quá trình tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7. Kết quả đã chứng minh rằng hàm lượng GABA trong môi trường nuôi cấy tăng đáng kể khi độ pH ban đầu tăng từ 4 lên 6. Hàm lượng GABA cao nhất là 22,609 ± 0,365 mM ở độ pH ban đầu là 6 (Hình 3). Khi tăng pH ban đầu lên 7 và 8, thì hàm lượng GABA giảm xuống lần lượt là 20,201 ± 0,389 mM và 17,789 ± 0,109 mM. Sự giảm này có thể là do vi sinh vật bị ức chế sự phát triển trong môi trường kiềm. Việc tạo ra



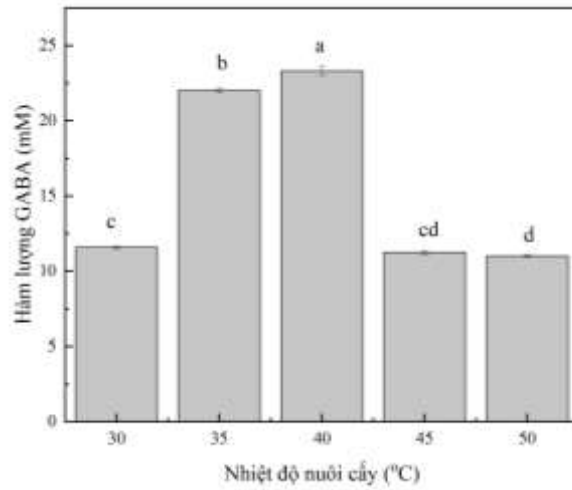
Hình 3. Ảnh hưởng của pH ban đầu lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7

Ghi chú: Các tế bào được nuôi trong môi trường MRS và 1,5% MSG, 50 mL dịch thanh long đỏ, 50 mL dịch sữa bò, mật độ ban đầu là 10^7 CFU/mL, pH khác nhau (4, 5, 6, 7 và 8) ở 37 °C trong 24 giờ. Các chữ cái in thường không giống nhau thể hiện sự khác nhau có nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

lactic acid trong quá trình lên men sẽ làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy, điều này cũng ảnh hưởng đến khả năng tăng trưởng của *P. acidilactici* TC7 và hoạt động của enzyme GAD. Có thể pH ban đầu là 6 thích hợp cho các tế bào *P. acidilactici* TC7 trong môi trường nuôi cấy, sau đó thúc đẩy sự phát triển của tế bào và chuyển tế bào sang pha tĩnh nhanh hơn so với độ pH ban đầu ở các giá trị khác. Một số nghiên cứu khác cho thấy pH ban đầu thích hợp cho các chủng vi khuẩn khác nhau là khác nhau, Komatsuzaki và cs. [23] cho rằng độ pH ban đầu bằng 5 là pH tối ưu để sản xuất GABA bởi *L. paracasei* NFRI 7415, trong khi *L. brevis* GABA100 tạo ra hàm lượng GABA tối đa ($26,5 \pm 2,8$ mg/mL) ở độ pH ban đầu là 5,5 trong quá trình lên men của nước quả mâm xôi đen [20].

3.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7

Cùng với pH nuôi cấy, nhiệt độ lên men cũng là một yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình sản xuất GABA bằng LAB [7]. Trong nghiên cứu này, *P. acidilactici* TC7 được cho vào môi trường MSR ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau, mật độ tế bào ban đầu 10^7 CFU/mL, môi trường có bổ sung 1,5% MSG, dịch thanh long đỏ và dịch sữa bò (Bảng 1) thì hàm lượng GABA đạt được sau 24 giờ lên men tăng lên khi tăng nhiệt độ lên men, hàm lượng GABA tăng rõ rệt từ 30 lên 40 °C (Hình 4). Nhiệt độ tối ưu là 40 °C, tại đó hàm lượng GABA đạt cao nhất là $23,294 \pm 0,290$ mM, tiếp tục tăng nhiệt độ nuôi cấy lên 45 °C và 50 °C thì hàm lượng GABA giảm xuống lần lượt là $11,255 \pm 0,142$ mM và $11,007 \pm 0,117$ mM. Điều này có thể là do nhiệt độ cao ảnh hưởng đến quá



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7

Ghi chú: Các tế bào được nuôi trong môi trường MRS và 1,5% MSG, 50 mL dịch thanh long đỏ, 50 mL dịch sữa bò, mật độ ban đầu là 10^7 CFU/mL, pH 6 ở các mức nhiệt độ nuôi cấy khác nhau (30, 35, 40, 45 và 50 °C) trong 24 giờ. Các chữ cái in thường không giống nhau thể hiện sự khác nhau có nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

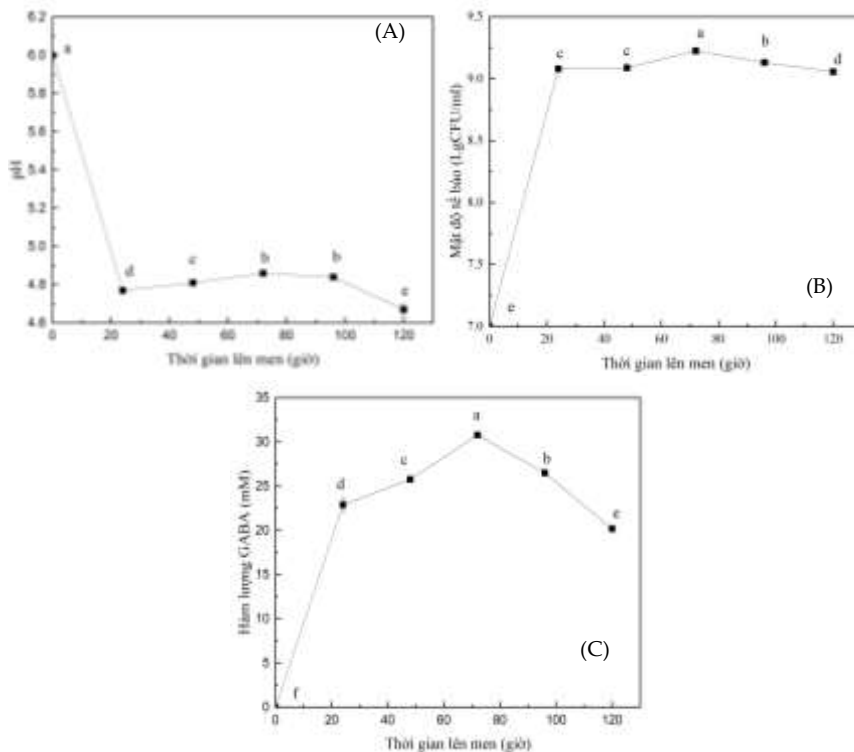
trình trao đổi chất của *P. acidilactici* TC7, đặc biệt là đối với hoạt động của hệ enzyme GAD [24]. Có thể là, nhiệt độ trên 40 °C có tác động không tốt đến sự phát triển của tế bào, dẫn đến giảm sự tích lũy GABA trong môi trường nuôi cấy, hoặc nhiệt độ lên men cũng có thể ảnh hưởng đến hệ thống GAD của *P. acidilactici* TC7, điều này cũng được xác định bởi một số nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của GAD thay đổi theo chủng LAB [24]. Theo Shin và cs. [24] đã chứng minh rằng nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của GAD trong *L. plantarum* ATCC 14917 là 40 °C, trong khi Liu và cs. [25] đã chỉ ra rằng GAD được tinh chế từ *L. brevis* F109-MD3 có nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của nó là 65 °C. Trên thực tế, các chủng khác nhau thậm chí của cùng một loài tạo ra lượng GABA tối đa ở các nhiệt độ khác nhau. Ví dụ, chủng *L. brevis* GABA 100 tạo ra lượng GABA cao hơn ở nhiệt độ lên men 30 °C so với 37 hoặc 25 °C [20], trong khi nhiệt độ tối ưu để sinh tổng hợp GABA của *L. brevis* CRL 1942 là 37 °C [26]. Trong nghiên cứu này, hàm lượng GABA cao nhất ở nhiệt độ nuôi cấy là 40 °C. Do đó, nhiệt độ này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.5 Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7

Nghiên cứu động học của quá trình sản xuất GABA bằng *P. acidilactici* TC7, pH, mật độ tế bào và hàm lượng GABA trong môi trường được đánh giá 24 giờ một lần trong quá trình lên men ở điều kiện thích hợp. Sau 24 giờ ủ đầu tiên, độ pH của môi trường giảm từ 6,0 xuống 4,77 (Hình 5A), với sự gia tăng mạnh về số lượng tế bào từ 7 lên $9,080 \pm 0,006$ log CFU/mL (Hình 5B) và

sự tích lũy GABA đạt được là $22,894 \pm 0,779$ mM. Hệ vi khuẩn lactic phát triển mạnh trong môi trường acid, vì vậy, khi pH giảm về pH acid số lượng tế bào tăng lên. Sự tăng lên của số lượng tế bào nên kéo theo sự tăng lên của việc sản xuất GABA (Hình 5C). Những thay đổi về độ pH, mật độ tế bào và hàm lượng GABA tương tự như những thay đổi được báo cáo bởi Lin [27] đối với *L. rhamnosus* YS9. Từ 24 đến 72 giờ lên men, số lượng tế bào của *P. acidilactici* TC7 tăng đều từ $9,080 \pm 0,006$ log CFU/mL đến $9,225 \pm 0,010$ log CFU/mL với sự tích lũy hàm lượng GABA dần dần đến mức tối đa là $30,784 \pm 0,104$ mM.

Sau 72 giờ, sự cạn kiệt chất dinh dưỡng dẫn đến sự suy giảm trong quá trình phát triển tế bào và sinh tổng hợp GABA. Việc giảm thêm độ pH của môi trường sau 72 giờ có tương quan với việc giảm hàm lượng GABA. Đương nhiên, decarboxyl hóa glutamate để tạo ra GABA sử dụng các ion hydro và việc trao đổi thêm GABA kiềm cho glutamate làm tăng độ pH của môi trường [28]. Do đó, việc giảm hàm lượng GABA sau 72 giờ có thể giải thích cho việc giảm thêm độ pH của môi trường.



Hình 5. Sự thay đổi giá trị pH (A), sự phát triển của tế bào (B) và hàm lượng GABA (C) trong quá trình lên men của *P. acidilactici* TC7

Ghi chú: Các tế bào được nuôi trong môi trường MRS và 1,5% MSG, 50 mL dịch thanh long đỏ, 50 mL dịch sữa bò, mật độ ban đầu là 10^7 CFU/mL, pH 6 ở 40 °C trong các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau (0, 24, 48, 72, 96 và 120 giờ). Các chữ cái in thường không giống nhau thể hiện sự khác nhau có nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

4 Kết luận

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy rằng các thông số thích hợp để *Pediococcus acidilactici* TC7 có khả năng sinh tổng hợp GABA cao là môi trường MRS có bổ sung 1,5% MSG, 50 mL dịch thanh long đỏ và 50 mL dịch sữa bò, pH ban đầu là 6, nhiệt độ 40 °C và thời gian nuôi cấy là 72 giờ. Trong điều kiện thích hợp đó, hàm lượng GABA đạt được là $30,784 \pm 0,104$ mM.

Tài liệu tham khảo

1. Matejcekova, Z., Liptakova, D., Valik, L. (2017), Functional probiotic products based on fermented buckwheat with *Lactobacillus rhamnosus*, *LWT Food Science and Technology*, 81, 35–41.
2. Manini, F., Casiraghi, M. C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., Plumed-Ferrer, C. (2016), Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough, *LWT Food Science and Technology*, 66, 275–283.
3. Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., Sanni, A. I. (2018), Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products, *Food Control*, 92, 225–231.
4. Szutowska, J. (2020), Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review, *European Food Research and Technology*, 246(3), 357–372.
5. Kim, D. H., Dasagrandhi, C., Park, S. K., Eom, S. H., Huh, M. K., Mok, J. S., Kim, Y. M. (2018), Optimization of gamma-aminobutyric acid production using sea tangle extract by lactic acid bacterial fermentation, *LWT Food Science and Technology*, 90, 636–642.
6. Rashmi, D., Zanan, R., John, S., Khandagale, K., Nadaf, A. (2018), γ -Aminobutyric Acid (GABA): Biosynthesis, Role, Commercial Production and Applications, *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, 57, 413–452.
7. 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), 1–21.
8. Diana, M., Quilez, J., Rafecas, M. (2014), Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review, *Journal of Functional Foods*, 10, 407–420.
9. Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Dyachkova, M. S., Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Averina, O. V., Orlova, V. S., and Danilenko, V. N. (2016), GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota, *Anaerobe*, 42, 197–204.
10. Sanchart, C., Rattanaporn, O., Haltrich, D., Phukpattaranont, P., and Maneerat, S. (2017), 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.
11. De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960), A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*, *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135.
 12. Trần Thanh Quỳnh Anh, Đỗ Thị Bích Thuý (2023), Ảnh hưởng của mật độ tế bào ban đầu và thành phần môi trường đến khả năng sinh tổng hợp Gamma - aminobutyric acid bởi chủng *Pediococcus acidilactici* TC7, *Tạp chí khoa học và công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, 1, 76–82.
 13. Yen, T. T., Quan, T. H., Nhung, H. T. H., Tram, G. P. N., Karnjanapratum, S., & Benjakul, S. (2022), Development of antioxidative red dragon fruit bar by using response surface methodology for formulation optimization, *Applied Food Research*, 2(2), 100173.
 14. Toupal, S., & Coşansu, S. (2023), Antioxidant and antimicrobial properties of freeze-dried banana and watermelon peel powders, *Food and Humanity*, 1(7), 607–613.
 15. Edith Marius, F. K., Pierre Marie, K., Blandine, M., Laverdure, T. P., Ulrich Daquain, F. T., & François, Z. N. (2023), Development of a non-dairy probiotic beverage based on sorrel and pineapple juices using *Lactocaseibacillus paracasei* 62L, *Journal of Agriculture and Food Research*, 14(2), 100688.
 16. Norouzi, M., Alamouti, A. A., Foroudi, F., Ahmadi, F., & Beiranvand, H. (2021), Performance of Holstein calves receiving increased nutrient intake through the addition of skim milk or milk replacer powder to the whole milk, *Animal Feed Science and Technology*, 278(6), 115013.
 17. Li, Y. ting, Chen, M. shun, Deng, L. zhen, Liang, Y. zhen, Liu, Y. kun, Liu, W., Chen, J., & Liu, C. me (2021), Whole soybean milk produced by a novel industry-scale microfluidizer system without soaking and filtering, *Journal of Food Engineering*, 291, 110228.
 18. Syu, K. Y., Lin C. L., Huang, H. C., Lin, J. K. (2008), Determination of theanine, GABA, and other amino acids in green, oolong, black, and Pu-erh teas with dabsylation and high-performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7637–7643.
 19. Beal, J., Farny, N. G., Haddock-Angelli, T., Selvarajah, V., Baldwin, G. S., Buckley-Taylor, R., Gershater, M., Kiga, D., Marken, J., Sanchania, V., Sison, A., & Workman, C. T. (2020), Robust estimation of bacterial cell count from optical density, *Communications Biology*, 3(1), 512.
 20. Kim, J. Y., Lee, M. Y., Ji, G. E., Lee, Y. S. and Hwang, K. T. (2009), Production of g-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100, *International Journal of Food Microbiology*, 130(1), 12–16.
 21. Liao, W., Wang, C., Shyu, Y., Yu, R., Ho, K. (2013), Influence of preprocessing methods and fermentation of adzuki beans on γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation by lactic acid bacteria, *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1108–1115.
 22. Zareie, Z., Tabatabaei Yazdi, F., 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.
23. Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., and Kimura, T. (2005), Production of g-amino- butyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods, *Food Microbiology*, 22(6), 497–504.
 24. Shin, S. -M., Kim, H., Joo, Y., Lee, S. -J., Lee, Y. -J., Lee, S. J. and Lee, D. -W. (2014), Characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and its C-terminal function for the pH dependence of activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(50), 12186–12193.
 25. Liu, W., Li, H., Liu, L., Ko, K. and Kim, I. (2021), Screening of gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and the characteristic of glutamate decarboxylase from *Levilactobacillus brevis* F109-MD3 isolated from kimchi, *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 1967–1977.
 26. Villegas, J. M., Brown, L., Savoy de Giori, G., and 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.
 27. Lin, Q. (2013), Submerged fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* YS9 for γ -aminobutyric acid (GABA) production, *Brazilian J Microbiol*, 44(1), 183–187.
 28. Sarasa, S. B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta D. R. F., Angayarkanni J. (2020), A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): Its production and role in microbes, *Curr Microbiol*, 77(4), 534–544.