

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CHŨNG VI KHUẨN PROBIOTIC *LACTOBACILLUS BREVIS* NCTH24 CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP GAMMA – AMINOBUTYRIC ACID VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG BIO – YOGURT

Quách Thị Việt, Dương Minh Khải, Đặng Thu Hương, Trần Thị Ngoan, Nguyễn La Anh*
Viện Công nghiệp thực phẩm

TÓM TẮT

Gamma aminobutyric acid (GABA) là loại amino acid không cấu tạo nên protein, có mặt trong tự nhiên; là chất có tác dụng giảm dẫn truyền xung động thần kinh, ngăn cản sự hoạt động thụ quá của các neuron thần kinh trong não và tăng cường cảm giác thư thái. GABA có sẵn trong một số loại thực vật hoặc được sinh tổng hợp từ vi khuẩn, nấm men và nấm mốc... Chủng vi khuẩn probiotic *Lactobacillus brevis* NCTH24 có khả năng sống sót qua đường ruột dạ dày và có khả năng chuyển hóa glutamate thành GABA được ứng dụng thử nghiệm trong làm sữa chua sinh học (bio- yogurt). Khả năng sống sót của NCTH24 khá cao: trong môi trường dịch dạ dày nhân tạo sau 120 phút bị giảm 2,67 log(10) CFU/ml; trong môi trường dịch ruột nhân tạo sau 240 phút giảm 0,56 log(10) CFU/ml. Chủng NCTH24 có khả năng bám dính trên màng nhầy ruột *in vitro* ở 37° C sau 1 giờ với tỷ lệ 1,94%, tương ứng với $2,66 \times 10^7$ CFU/cm². Sinh khối của NCTH24 được thu nhận sau khi lên men bằng phương pháp ly tâm, rửa bằng nước muối NaCl 0,85% pH 6,5 và bảo quản trong dung dịch trehalose 5%, sau đó được bổ sung vào sữa chua sản xuất bằng phương pháp thông dụng với với mật độ tế bào là $3,75 \times 10^8$ CFU/ml để tạo sản phẩm sữa chua sinh học. Sau 45 ngày bảo quản tại 4° C, sữa chua vẫn có độ sánh mịn, vị chua ngọt hài hòa và hương vị dễ chịu, mật độ chủng NCTH24 được xác định ở mức $1,75 \times 10^7$ CFU/g và vẫn duy trì khả năng sinh tổng hợp GABA.

Từ khóa: vi khuẩn lactic, *Lactobacillus brevis*, probiotic, GABA, bio – yogurt

MỞ ĐẦU

Gamma aminobutyric acid (GABA) là amino acid không tham gia cấu tạo nên protein và không thể thiếu đối với cơ thể nhằm đảm bảo duy trì sự hoạt động bình thường của não bộ đặc biệt là các neuron thần kinh (Hayakawa *et al.*, 2005). GABA có chức năng ngăn cản các tín hiệu căng thẳng và bắt an đến vùng thần kinh trung ương bằng việc chiếm giữ hoặc không chế các vùng tiếp nhận thông tin của các tế bào này. Nhờ đó giúp cho con người có giấc ngủ ngon và sâu hơn, cải thiện trạng thái tâm lý, bệnh trầm cảm (Manyam *et al.*, 1981).

GABA được phân bố rộng rãi trong tự nhiên. GABA có nhiều nhất trong não của các động vật có vú. Ngoài ra còn tồn tại với một lượng thấp trong một số bộ phận như nớt rễ, lá... của số loại thực vật như cà chua, chuối, rau bina, lá chè xanh... GABA cũng được tìm thấy ở một số vi sinh vật như các chủng vi khuẩn, nấm men, nấm mốc (Abe *et al.*, 1995; Rizzello *et al.*, 2008).

Một số vi khuẩn lactic (LAB) có khả năng sinh tổng hợp GABA. Vi khuẩn lactic (LAB) là vi khuẩn được coi là an toàn (GRAS- generally regarded as safe) và đóng vai trò chính trong sản xuất thực phẩm lên men truyền thống. Gần đây việc nghiên cứu và ứng dụng vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp GABA được quan tâm rộng rãi. Sản phẩm thịt lên men truyền thống của Thái Lan (Nham) được lên men bởi *Lactobacillus namurensis* có khả năng sinh tổng hợp GABA (Anussara Ratanaburee *et al.*, 2013). Ở Nhật, nhiều loại thực phẩm truyền thống giàu GABA như gummaloone, phở mai, trà gabaron và shochu (Nomura *et al.*, 1998; Sawai *et al.*, 1998; Yokoyama *et al.*, 2002); ở các nước khác có nước quả mận xối đen (Kim *et al.*, 2009), kim chi (Seok *et al.*, 2008), phomat (Nomura *et al.*, 1998). Những sản phẩm chứa GABA tự nhiên này được xác định là an toàn qua bề dày lịch sử lâu đời của chúng và gần đây được chứng minh là có lợi cho sức khỏe (Leroy *et al.*, 2004).

Vi khuẩn lactic sinh tổng hợp GABA còn có tác dụng là probiotics nhưng chỉ khi chúng sống sót qua được dạ dày- ruột, và ở đây chúng có tác dụng hỗ trợ hệ tiêu hóa và sinh tổng hợp GABA in situ (Radhika Dhakal *et al.*, 2012). Một số vi dụ điển hình như *Lb. paracasei* PF6, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PR1, and *Lb. plantarum* C48 (Li *et al.*, 2010; Siragusa *et al.*, 2007). Một trong hướng ứng dụng LAB sinh GABA làm probiotic là sữa chua sinh học (bio-yogurt). Có nhiều phương pháp sản xuất sữa chua sinh học, nhưng khá phổ biến là lên men sữa bởi chủng giống khởi động thông thường và bổ sung sinh khối vi khuẩn probiotic vào giai đoạn sau lên men (Nomura *et al.*, 1998). Yêu cầu của các sản phẩm probiotic trong đó có sữa chua sinh học là mật độ tế bào sống phải đạt ít nhất 10^8 CFU/g trong thời gian sử dụng sản phẩm.

Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn probiotic *Lactobacillus brevis* NCTH24 có khả năng sinh tổng hợp GABA được ứng dụng thử nghiệm để làm sữa chua sinh học. Chủng này được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống Nem chua Thanh Hóa. Các nghiên cứu về đặc điểm chủng giống và khả năng tồn tại trong sữa chua đã được khảo sát.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống

Chủng *Lactobacillus brevis* NCTH24 được phân lập từ Nem chua Thanh Hóa, được định tên, nghiên cứu đặc điểm sinh lý sinh hóa (nhiệt độ, pH, khả năng lên men đường, khả năng kháng kháng sinh, kháng vi sinh vật gây bệnh) và lưu giữ tại bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm.

Môi trường

Môi trường nuôi cấy: Môi trường lên men cho các chủng vi khuẩn lactic là môi trường MRS: Peptone 10g; casein mer. 15 g, glucose 20 g; Tween 80 1g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2,62 g; CH_3COONa 5 g; $(NH_4)_2SO_4$ 2,15 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g. $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,05 g; Nước 1000 ml; pH 6,5 -6,8. Chế độ thanh trùng 121° C trong 15 phút. Chủng NCTH24 được hoạt hóa từ ống bảo quản thạch đứng hoặc ống bảo quản lạnh sâu sang môi trường hoạt hóa MRS lỏng (7 ml/ống), thời gian 24 h/30° C.

Môi trường sinh tổng hợp GABA: Môi trường MRS lỏng bổ sung thêm 1% monosodium glutamate. Chế độ thanh trùng 121° C/15 phút

Xác định tên loài của chủng NCTH24

Xác định tên chủng được sử dụng bằng phương pháp xác định khả năng sử dụng đường và phân tích trình tự so sánh với trình tự 16S rDNA. Mỗi được sử dụng là 16S-8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 16S-1510R (5'-GGCTACCTGTTCACGA-3'). Trình tự 16S rDNA này được so sánh với cơ sở dữ liệu tại ngân hàng gen.

Phương pháp nuôi cấy vi sinh vật

Chủng *Lactobacillus brevis* NCTH24 được hoạt hóa từ ống bảo quản thạch đứng hoặc môi trường bảo quản lạnh sâu sang môi trường MRS lỏng, thời gian 24 h/30° C. Tiếp đó, chủng NCTH24 được lên men trong các ống nghiệm hoặc trong các bình Erlenmeyer. Kết thúc lên men, kiểm tra mật độ tế bào bằng cách pha loãng trong dung dịch NaCl 0,85% pH 4,5 và trang cấy trên đĩa MRS agar. Thời gian 48-72 h/30° C.

Phương pháp xác định khả năng sống trong môi trường dịch dạ dày và dịch ruột nhân tạo

Môi trường dịch dạ dày được chuẩn bị 3 g pepsine 10000 đơn vị hoạt lực trong 1L dung dịch đệm glycine - HCl 0,2 M pH 2. Môi trường dịch ruột nhân tạo sử dụng 1 g/l pancreatin (Sigma) trong dung dịch 0,5% w/v NaCl chứa 0,3% w/v Ox bile dried pure (Merck) pH 8. Sinh khối vi sinh vật sau khi lên men 24h trên môi trường MRS được ly tâm và rửa 2 lần bằng đệm PBS (0,02% KCl, 0,144% Na_2HPO_4 , 0,8% NaCl, 0,024% KH_2PO_4 , pH 7). Sau đó thực hiện kiểm tra khả năng sống sót trong môi trường dịch dạ dày ở 120 phút và dịch ruột tại 240 phút ở nhiệt độ 37° C. Kết thúc thời gian ủ, tiến hành trang cấy trên môi trường MRS agar để kiểm tra mật độ tế bào. Mật độ tế bào log(10) CFU/ml được tính tại thời điểm kết thúc thời gian ủ và thời điểm 0 phút. Tỷ lệ tế bào sống sót được tính theo % hoặc sự giảm mật độ tế bào giá trị log(10) CFU/ml của sinh khối tại thời điểm sau khi ủ so với thời điểm ban đầu.

Phương pháp xác định khả năng bám dính

Màng nhầy ruột lợn được xử lý bằng hóa chất và đông khô, bảo quản tại -20° C, tương tự cách xử lý của Ouwehand và cộng sự (Ouwehand et al., 2002). Phò dung dịch màng nhầy ruột nồng độ 1,5mg/ml trong dung dịch HEPES 10 mM, pH 7,4 vào đĩa vi chuẩn 24 giếng và ủ qua đêm ở 4° C. Sinh khối vi sinh vật sau khi kết thúc lên men được ly tâm, rửa 2 lần trong dung dịch HEPES 10 mM pH 7,4 và hòa lại sinh khối trong dung dịch này. Lấy mẫu, kiểm tra mật độ tế bào bằng phương pháp trang cấy trên MRS agar, pha loãng mẫu trong dung dịch NaCl 0,85% pH 6,5 thời gian 48-72 h/30° C. Đĩa vi chuẩn sau khi ủ qua đêm được rửa 2 lần bằng dung dịch HEPES, tiếp đó bổ sung dịch sinh khối vi sinh vật, ủ tại 37° C trong 1 giờ. Kết thúc thời gian ủ, thực hiện rửa 2 lần nhằm tách các tế bào không bám dính ra ngoài. Sau đó, bổ sung dung dịch HEPES 10 mM pH 7,4 chứa 0,1% Triton X vào giếng để tách màng nhầy và các tế bào bám dính, trộn đều. Phần dịch thu được thực hiện pha loãng mẫu bằng dịch NaCl 0,85% pH 6,5 trong 0,1% Triton X. Trang cấy trên MRS agar, nuôi ở 30° C/48-72 h để kiểm tra mật độ tế bào bám dính trên diện tích bề mặt đĩa vi chuẩn có phủ màng nhầy (CFU/cm²). Song song với việc xác định mật độ tế bào bám dính, phần bản mẫu được xử lý và chụp SEM (Scanning electron microscope, Hitachi S 4800).

Phương pháp nuôi cấy trong môi trường tạo GABA

Chủng NCTH24 được nuôi trong môi trường MRS lỏng có bổ sung 1% sodium glutamate, điều kiện nuôi cấy 24 h/30° C. Kết thúc 24h, thực hiện ly tâm 10000 rpm/10 phút/4° C. Phần dịch trong sử dụng để tiến hành chạy sắc ký bản mỏng để phát hiện GABA.

Phương pháp xác định GABA bằng sắc ký bản mỏng TLC (Thin layer chromatography)

Các hóa chất và dụng cụ: Các tấm bản mỏng silicagel; dung dịch GABA chuẩn; dung dịch chạy là monosodium glutamate (MSG); hỗn hợp dung môi chạy: n-butanol; axit acetic; nước cất với tỷ lệ tương ứng 5:3:2 (dung môi trước khi chạy cần được pha sẵn và để ổn định qua đêm); dung dịch hiển thị là 2% ninhydrin trong N-butanol; máy sấy và tủ sấy.

Tiến hành: Các tấm Silicagel 60 F254 (Merck) trước khi chạy TLC cần phải được sấy khô ở nhiệt độ 90° C/10 phút. Châm 2 μ l mẫu/điểm lên tấm bản mỏng. Mẫu đối chứng là hỗn hợp sodium glutamate và GABA. Đặt bản mỏng đã chấm mẫu vào bình dung môi để tiến hành chạy TLC, thời gian từ 90 đến 120 phút. Khi dung môi cách mép trên bản mỏng khoảng 1 cm thì dừng quá trình chạy sắc ký bằng cách lấy tấm bản mỏng ra ngoài, phun dung dịch hiển thị ninhydrin 2% và đặt trong tủ sấy ở 90° C trong 10-15 phút.

Quy trình sản xuất sữa chua sinh học (bio - yogurt)

Chủng *Lactobacillus brevis* NCTH24 được hoạt hóa từ ống bảo quản thạch đứng hoặc từ ống bảo quản lạnh sâu sang môi trường MRS lỏng, thời gian hoạt hóa 24 h/30° C. Sau đó, thực hiện lên men trong các bình Erlenmeyer, điều kiện lên men: tỷ lệ tiếp giống 10%; thời gian 24 h, nhiệt độ 30° C. Kết thúc lên men, ly tâm tại 10000 rpm/10 phút/4° C và rửa sinh khối 2 lần bằng dung dịch NaCl 0,85% pH 6,5. Phần sinh khối này được bảo quản trong dung dịch trehalose 5% tại 4° C, mật độ tế bào đạt khoảng $3,7 \times 10^9$ CFU/ml.

Sữa loại bột trùng (Vinamilk) được bổ sung thêm chất ổn định, thực hiện khuấy trộn và đồng hóa tại 65° C/20 phút. Sau đó, thanh trùng tại 90° C/5 phút và làm nguội về nhiệt độ 42° C. Bổ sung giống khởi động YOMIX (Danisco) lên men tại

42° C/12 h. Giống khởi động YOMIX gồm *Lactobacillus bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*; các chủng này không có khả năng sinh tổng hợp GABA.

Kết thúc lên men, bổ sung sinh khối chủng NCH24 trong trehalose 5% được bổ sung vào sữa chua với mật độ ban đầu đạt 10^8 CFU/g. Sản phẩm được khuấy trộn đều và được rót hộp, bảo quản tại 4°C trong 45 ngày. Hàng ngày lấy mẫu đánh giá cảm quan và kiểm tra mật độ tế bào NCH24 theo thời gian bằng phương pháp trang cấy. Tế bào NCH24 được phân lập từ sữa chua trong thời gian bảo quản và được kiểm tra khả năng sinh tổng hợp GABA.

Đánh giá cảm quan sữa chua theo các chỉ tiêu về màu sắc, mùi vị, độ nhớt, pH.

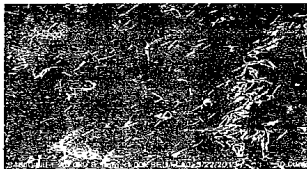
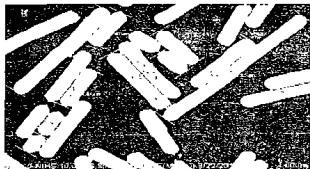
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm chủng *Lactobacillus brevis* NCH24

Chủng vi khuẩn NCH24 được nghiên cứu các đặc điểm hình thái, đặc tính sinh lý, sinh hóa và định tên. Dựa vào trình tự 16S rDNA chủng NCH24 so sánh với ngân hàng gen cho thấy tương đồng 100 % (1381/1381 bp) với đoạn 16S của vi khuẩn *Lactobacillus brevis* JF965392. Kết quả thể hiện ở Bảng 1:

Bảng 1. Kết quả trình tự gen 16S rDNA của chủng NCH24

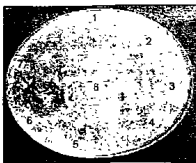
```
CGTTGAAATGACGTGCTTGCACTGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAAACAGTGGGAAATCGCCAGAAAGCGGGGATAACACTT
GGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAMATCCGCATGGATTTTGTGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTCTGGATGATCCGCGGGGATATAG
TTAGTTGGTGAGGTAAGCGCCACCAAGACCATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAACTGGCGCACATTGGGAAGTGGAGACAGCCCAAACTCTCA
CGGGAGGCGAGCAGTAGGGAAATCTCCACAATGGAGCAAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGGTGAAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTGTG
TAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACAGAAAGCCAGCGGCTAACTACGTCCAGCAGCCGGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTGTGTCGGGATTTATGGGGGTAAAGCGAGCCAGCGGGTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGGAGAAAGTGCATGG
GAAACTGGGAGACTTGAATGCGAAGAGGAGCAGTGGAACTCCATGTGTAGCGTGGAAATCGGTAGATAATGGAAAGAACCAAGTGGCGAAGCGCGG
TGTCTAGTCTGTAAGTACGCGCTGAGGCTGGAAAGCATGGGTAGCGAAACAGGATAGATAACCGTGGTAGTCATGCCCTTAACGATGATGCTAGTGT
TGGAGGTTCCGCCCTTCAAGTGCAGCGTAACGCATTAAGCAGTCCGGCTGGGGATACBACCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGG
CCCGCADAAGCGGTGGACATGTGGTTAACTGAAAGCTACCGGAGAACCTTACCAGTCTTGCACATCTCTGCCAACTTAAAGATTAAGACGTTC
TTCCGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTGTGTGCTGAGATGTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCCCAACCTTATATCACTT
GCCAGCTTCAAGTGGGCACCTGGTGAAGTCCGGCTACAACCCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATACCTCCCTTATGACCTGGGCT
ACACAGTGTCTACAATGGACGTACAACAGTGTGGGAAGTGTGAGSCTAAGCTAATCTCTAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTTGATGGCTGCAACTG
CTACATGAAGTGGAACTCGTAGTATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCGGGCCCTTGTACACACCGCCGCTCACACCATGAAGAT
TGTACACCC
```



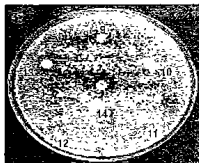
Hình 1. Hình thái chủng *Lactobacillus brevis* NCH24.

Hình 2. Khả năng bám dính trên niêm mạc ruột nhân tạo.

Chủng *Lactobacillus brevis* NCH24 có tế bào trực khuẩn, với kích thước 0,581 $\mu\text{m} \times (0,852+6,25) \mu\text{m}$ (Hình 1), Gram (+), catalase (-), lên men dị hình. Chủng NCH24 có khả năng lên men tốt các loại đường: glucose, xylitol, ribose và sử dụng được các loại đường khác như Na-glucose, fructose, arabinose, galactose. Ngoài ra, chủng NCH24 có khả năng chịu được dải pH từ 4,0 đến 9,6 và phát triển ở dải nhiệt độ từ 30°C đến 37°C. Chủng NCH24 có khả năng ức chế sự phát triển một số vi sinh vật gây bệnh như: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* và *Listeria monocytogenes* (kết quả không thể hiện). Trên Hình 3 cho thấy phổ tương tác chủng NCH24 với một số kháng sinh.



- 1-Clindamycin
- 2- Cefazolin
- 3- Cefazidime
- 4- Ceftriaxone
- 5- Cefepozone
- 6- Erythromycin
- 7- Chloramphenicol
- 8- Penicillin



- 9- Polymyxin B
- 10- Ofloxacin
- 11- Streptomycin
- 12- ĐC (nước)
- 13- Gentamycin
- 14- Azithromycin

Hình 3. Hình ảnh phổ tương tác chủng NCH24 với một số loại kháng sinh

Khả năng probiotic của chủng *Lactobacillus brevis* NCTH24

Một trong những tiêu chí chính để lựa chọn các chủng vi khuẩn probiotics là khả năng sống sót trong dịch dạ dày, dịch ruột và khả năng bám dính. Khảo sát trong số 262 chủng vi khuẩn lactic và *Bifidobacterium*, lựa chọn được 27 chủng có khả năng sống sót trong môi trường dịch dạ dày và dịch ruột tốt. Trong số đó có chủng *Lactobacillus brevis* NCTH24.

Kết quả trên Bảng 2 cho thấy, khi vi sinh vật đi vào dạ dày, do pH trong môi trường dạ dày khá thấp (khoảng pH 2) nên làm giảm một số lượng khá lớn vi sinh vật. Chủng NCTH24 ban đầu vào dịch dạ dày xác định được $2,35 \times 10^8$ CFU/ml sau thời gian 120 phút trong dịch dạ dày mật độ tế bào còn lại là 5×10^8 CFU/ml tức là mật độ tế bào giảm $2,67 \log(10)$ CFU/ml.

Bảng 2. Khả năng probiotic của chủng NCTH24

Khả năng sống trong dịch dạ dày			Khả năng sống trong dịch ruột			Khả năng bám dính trên màng nhầy ruột	
0 phút (CFU/ml)	120 phút (CFU/ml)	Sự giảm Log(10) CFU/ml	0 phút (CFU/ml)	120 phút (CFU/ml)	Sự giảm Log(10) CFU/ml	Tỷ lệ bám dính (%)	Sau 60 phút (CFU/cm ²)
$2,35 \times 10^8$	$5,00 \times 10^6$	2,67	$4,52 \times 10^8$	$1,25 \times 10^8$	0,56	1,94	$2,66 \times 10^7$

Sau khi vi sinh vật qua dạ dày rồi tiếp tục di chuyển đến dịch ruột, khi này môi trường có nồng độ muối mật khá cao. Sau khi khảo sát chủng NCTH24 cho thấy, chủng NCTH24 có khả năng chịu muối mật khá tốt (thể hiện mật độ tế bào giảm không đáng kể là 0,56 CFU/ml).

Khả năng bám dính cũng là một trong những tiêu chí cần khảo sát với các chủng vi khuẩn probiotic. Probiotics còn có vai trò bảo vệ chất nhầy đường ruột nhờ sự tổng hợp và tiết ra các peptit có tính kháng khuẩn, mucins, do đó ngăn chặn sự bám dính của vi sinh vật gây bệnh với biểu bì ruột. Khả năng bám dính của chủng NCTH24 khá tốt, mật độ tế bào ban đầu trước khi bám dính là $1,37 \times 10^9$ CFU/cm², sau 60 phút tại 37°C, mật độ tế bào bám dính trên niêm mạc ruột đạt $2,66 \times 10^7$ CFU/cm². Hình ảnh chụp SEM cũng cho thấy tế bào NCTH24 bám dính khá dày trên phiến mẫu polystyrene phủ chất nhầy ruột (Hình 1 và 2).

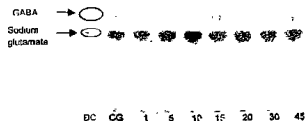
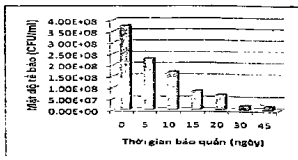
Ứng dụng sản xuất sữa chua sinh học có chứa GABA

Vi khuẩn lactic có nguồn gốc từ thực phẩm lên men truyền thống được khẳng định là an toàn vì được sử dụng qua nhiều thế hệ. Chúng thường được ứng dụng làm giống khởi động và probiotic (Nomura *et al.*, 1998) Chủng *Lactobacillus brevis* NCTH24 có khả năng sinh tổng hợp GABA (dùng CG, Hình 5) và có đặc tính probiotic nổi trội nên được ứng dụng bằng cách bổ sung vào sữa chua sinh học (bio-yogurt).

Sữa chua yogurt được làm theo quy trình đã nêu và được bổ sung sinh khối NCTH24 với mật độ ban đầu là $3,75 \times 10^8$ CFU/ml. Mẫu được bảo quản tại 4°C và kiểm tra mật độ tế bào vi khuẩn trong mẫu sữa chua theo ngày.

Kết quả thu được cho thấy, mật độ tế bào chủng NCTH24 giảm dần theo thời gian bảo quản. Sau 5 ngày, mật độ tế bào giảm khá ít, đạt $2,65 \times 10^8$ CFU/ml; sau 45 ngày, mật độ tế bào còn lại $1,75 \times 10^7$ CFU/ml (Hình 4). Kết quả này rất khả quan, thể hiện khả năng sống sót tốt của NCTH24 trong sữa chua. Theo tiêu chuẩn về sữa chua bổ sung probiotic là mật độ tế bào probiotic phải ít nhất đạt 10^6 CFU/ml sau 45 ngày bảo quản (Codex standard for fermented milks -2003).

Tế bào khuẩn lactic NCTH24 phân lập từ sữa chua trong thời gian bảo quản, được kiểm tra khả năng sinh tổng hợp GABA trên môi trường đặc chủng MRSS. Kết quả bằng TLC cho thấy chúng vẫn khả năng sinh tổng hợp GABA sau 45 ngày bảo quản sữa chua tại 4°C và không có sự khác biệt so với chủng gốc ban đầu (Hình 5)



Hình 4. Mật độ tế bào NCTH 24 trong sữa chua theo thời gian bảo quản

Hình 5. Khả năng sinh GABA của chủng NCTH24 trong sữa chua sinh học: DC- mẫu nền hợp GABA và MSG; CG- chủng gốc NCTH24; 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 là số ngày bảo quản của mẫu sữa chua mà từ đó NCTH 24 được phân lập ra

Tuy nhiên phân tích TLC mẫu sữa chua sinh học, không phát hiện trong sữa chua có GABA (kết quả không thể hiện). Tiến hành đánh giá cảm quan mẫu sữa chua sinh học, kết quả cho thấy, sản phẩm có độ sánh mịn, vị chua hài hòa (pH khoảng 4,0) và hương vị dễ chịu.

Như vậy ưu điểm của phương pháp bổ sung sinh khối probiotic vào sữa chua là không làm thay đổi về tính chất cảm quan của sản phẩm mà vẫn tạo thêm công dụng cho sữa chua. Sản phẩm này có tiềm năng ứng dụng cao vì tế bào

Lactobacillus brevis NCTH24 sống sót qua đường dạ dày-ruột, sẽ bám dính vào màng nhầy ruột, sinh sôi phát triển và đồng thời tổng hợp GABA *in situ* khi gặp cơ chất phù hợp. Việc đánh giá hàm lượng GABA do LAB probiotic sinh ra trong đường ruột là chưa thực hiện được. Hiện nay trên thế giới cũng chưa có công bố về vấn đề này. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đánh giá việc sử dụng thực phẩm lên men bởi LAB sinh tổng hợp GABA cho thấy chúng có tác dụng tốt đối với huyết áp (Inoue et al., 2003; Hayakawa et al., 1997).

KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn NCTH24 được định tên *Lactobacillus brevis* bằng kỹ thuật 16S rDNA. Chủng *Lactobacillus brevis* NCTH24 trực khuẩn, lên men dị hình; có khả năng lên men tốt đường glucose, xytilol, ribose và có khả năng phát triển tốt trong dải nhiệt độ pH 4,0 + 9,6 và nhiệt độ 30+37°C.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus brevis* NCTH24 là vi khuẩn probiotic có tỷ lệ sống sót trong môi trường dịch dạ dày nhân tạo sau 120 phút bị giảm 2,67 log(10) CFU/ml; trong môi trường dịch ruột nhân tạo sau 240 phút giảm 0,56 log(10) CFU/ml và khả năng bám dính trên màng nhầy ruột *in vitro* ở 37°C sau 1 giờ là $2,68 \times 10^7$ CFU/cm².

Chủng NCTH24 có khả năng sinh GABA và được ứng dụng vào sản xuất sữa chua sinh học với mật độ tế bào ban đầu là $3,75 \times 10^8$ CFU/ml. Sau 45 ngày bảo quản tại 4°C, sữa chua vẫn có độ sánh mịn, vị chua hài hòa, hương vị dễ chịu, mật độ vẫn đạt $1,75 \times 10^7$ CFU/ml và vẫn duy trì khả năng sinh tổng hợp GABA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abe Y, Ūmemura S, Sugimoto K, Hirawa N, Kato Y, Ypkoyama N, Yokoyama T, Junichi I, Maeo I (1995) Effect of green tea rich in γ -Aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats. *American Journal of Hypertens* 8(1): 74-79
- Choi S.I, Lee J.W, Park, S.M, Lee M.Y, Ge J.I, Park M.S, Heo T.R (2006). Improvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 562-568.
- Hayakawa K, Maysayuki K, Yamon Y (2005). Role of the renal nerves in γ -aminobutyric acid-induced anti-hypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology* 524: 120-125.
- Huang J, Mei L, Wu H, Lin D (2007). Biosynthesis of camnobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis* World J. *Microbiol. Biotechnol.* 23, 865-871.
- Inoue K, Shirai T, Ochiai H, Kasao M, Hayakawa K, Kimura M, Sansawa H (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 490-495.
- Leroy F, Vuyst L.D (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67-78.
- Namura M, Kimot M, Somaya Y, Funakawa S, Suzuki I (1998). Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 81, 1486-1491.
- Ouweland A.C, Salminen S. and Isolauri E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279-289.
- Radhika Dhakal, Vivèk K. Bajpai, Kwang-Hyun Baek (2012). Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* : 1230-1241
- Sawai Y, Yamaguchi Y, Miyana D, Yoshitomi H (2001). Cycling treatment of anaerobic and aerobic incubation increases the content of gamma-butyric acid in tea shoots. *Amino Acids* 20, 331-334.

CHARACTERISATION OF PROBIOTIC BACTERIUM *Lactobacillus brevis* NCTH24 PRODUCING GAMMA – AMINO BUTYRIC ACID AND POTENTIAL APPLICATION IN BIO - YOGURT

Quach Thi Viet, Duong Minh Khai, Dang Thu Huong, Tran Thi Ngoan, Nguyen La Anh*

Food Industries Research Institute

SUMMARY

GABA is a non-protein amino acid and a natural major inhibitory neurotransmitter, which produces signals in the brain that keeps brain activity from rising too high; thus it is a calming agent. GABA is a bioactive constituent of fruits, vegetables, cereals and biosynthesized by some bacteria, yeast and fungi. The bacterial strain *Lactobacillus brevis* NCTH24 showed high survival ability in artificial gastrointestinal fluids, produced GABA by the decarboxylation of glutamic acid, thus the highly potential probiotic that was applied in bio-yogurt production. It revealed that bacterial cells NCTH24 decreased 2,67 log(10) CFU/ml after 120 min in gastric solution pH2 and 0,56 log(10) CFU/ml after 240 min in bile solution. The adherence ability on intestinal mucus of NCTH24 was examined *in vitro* and determined that 1 94% of flooded cells were able to adhere on the mucus coated plastic microtiter plate, which was counted for $2,66 \times 10^7$ CFU/cm². The biomass of NCTH24 was obtained by centrifugation of cultural suspension after fermentation, washed with 0.85% saline pH 6.5 and preserved in 5% trehalose solution. The bio-yogurt was produced by following steps: milk fermentation with commercial starter and then addition with NCTH24 biomass to reach cell density $3,75 \times 10^8$ CFU/g of final product. After 45 days of storage at 4°C, the organoleptic properties of the yogurt remained unchanged with smooth structure, total harmony between sweet and sour taste, and pleasant flavor; the population of NCTH24 was determined at $1,75 \times 10^7$ CFU/ml and still maintained the capability of GABA biosynthesis.

Key word: lactic acid bacteria, *Lactobacillus brevis*, probiotic, GABA, bio - yogurt

*Author for correspondence; Tel: +84-4-38583450, Email: anhnl@fri.vn