

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

Nguyễn Thị Anh Đào

**TUYỂN CHỌN, NGHIÊN CỨU CÁC CHỦNG VI KHUẨN
LACTOBACILLUS CÓ KHẢ NĂNG SINH GAMMA-
AMINOBUTYRIC ACID(GABA) VÀ MỘT SỐ ĐẶC TÍNH
PROBIOTIC ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT
CÁC THỰC PHẨM CHỨC NĂNG**

Chuyên ngành: Động vật học (Vi sinh vật học)

Mã số: 8 42 01 03

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

PGS.TS. DƯƠNG VĂN HỢP

Hà Nội – 2018

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành khóa học thạc sĩ của mình, tôi vô cùng biết ơn các thầy cô giáo trong Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình truyền đạt kiến thức quý báu và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới thầy giáo PGS.TS.Dương Văn Hợp, người đã tận tình hướng dẫn và đóng góp nhiều kinh nghiệm quý báu cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu đề tài và hoàn thành luận văn.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học- Đại học Quốc gia Hà Nội đã giúp đỡ tôi rất nhiều trong suốt quá trình nghiên cứu hoàn thành luận văn.

Cuối cùng tôi xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè đã động viên, khuyến khích tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày 27 tháng 10 năm 2018

Nguyễn Thị Anh Đào

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan, luận văn này là kết quả nghiên cứu và làm việc của tôi, các nội dung nghiên cứu kết quả trình bày trong luận văn là trung thực, rõ ràng. Nếu có bất kỳ vấn đề gì xảy ra, tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm.

Hà Nội, ngày 27 tháng 10 năm 2018

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Anh Đào

MỤC LỤC

Trang

LỜI CẢM ƠN	
LỜI CAM ĐOAN	
MỤC LỤC	
DANH MỤC BẢNG BIỂU	
DANH MỤC HÌNH ẢNH	
BẢNG CÁC CHỮ VIẾT TẮT	
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	2
1.1. Probiotic	2
1.1.1. Định nghĩa.....	2
1.1.2. Vai trò của probiotic.....	2
1.2. Vi khuẩn lactic trong sản xuất probiotic.....	7
1.2.1. Một số đối tượng vi sinh vật phổ biến trong sản xuất probiotic.....	7
1.2.2. Vi khuẩn lactic trong sản xuất probiotic	8
1.3. Tổng quan về Gamma - Aminobutyric Acid.....	10
1.3.1. Giới thiệu.....	10
1.3.2. Hình dạng và cấu trúc của GABA.....	10
1.3.3. Thụ thể GABA.....	11
1.3.3.1. Thụ thể GABA _A	12
1.3.3.2. Thụ thể GABA _B	13
1.3.4. Quá trình tổng hợp GABA trong não.....	14
1.3.5. Cơ chế hoạt động của GABA.....	15
1.3.6. Chức năng của GABA.....	15
1.3.7. Các nguồn sinh tổng hợp GABA.....	17
1.3.8. Sinh tổng hợp GABA từ vi khuẩn.....	18
1.3.9. Tình hình nghiên cứu về GABA.....	19

CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23
2.1. Nguyên liệu.....	23
2.2. Hóa chất và thiết bị.....	23
2.2.1. Hóa chất.....	23
2.2.2. Thiết bị và dụng cụ.....	23
2.3. Các loại môi trường nghiên cứu.....	24
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	26
2.4.1. Phương pháp định tính GABA bằng sắc ký bản mỏng (TLC).....	26
2.4.2. Phương pháp định lượng GABA.....	27
2.4.3. Phương pháp phân loại.....	29
2.4.3.1. Phân loại dựa trên phân tích trình tự rDNA.....	29
2.4.3.2. Phân loại bằng phương pháp quan sát hình thái.....	32
2.4.4. Xác định các đặc tính probiotics của các chủng vi khuẩn lựa chọn....	33
2.4.4.1. Phương pháp xác định khả năng chịu axit.....	33
2.4.4.2. Phương pháp xác định khả năng chịu muối mật.....	34
2.4.4.3. Phương pháp xác định khả năng sống trong môi trường dịch dạ dày và dịch ruột giả lập.....	34
2.4.4.4. Phương pháp xác định khả năng bám dính <i>in vitro</i>	35
2.4.4.5. Phương pháp xác định khả năng kháng kháng sinh	36
2.4.4.6. Kiểm tra khả năng ức chế một số chủng vi sinh vật gây bệnh	36
2.4.4.7. Phương pháp xác định khả năng sinh axit lactic.....	37
2.4.5. Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tạo GABA và sinh khối cao của các chủng vi khuẩn lựa chọn.....	37
2.4.5.1. Lựa chọn môi trường.....	38
2.4.5.2. Lựa chọn nhiệt độ nuôi cấy thích hợp.....	38
2.4.5.3. Lựa chọn pH môi trường nuôi cấy thích hợp.....	38

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	40
3.1. Lựa chọn chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp GABA.....	40
3.2. Phân loại.....	42
3.2.1. Phân loại dựa trên phân tích trình tự rDNA	42
3.2.2. Hình thái của các chủng <i>Lactobacillus</i> nghiên cứu.....	43
3.2.2.1. Chủng VTCC-B-421.....	43
3.2.2.2. Chủng VTCC-B-426.....	44
3.2.2.3. Chủng VTCC-B-431.....	45
3.2.2.4. Chủng VTCC-B-1450.....	45
3.3. Xác định các đặc tính probiotics của các chủng vi khuẩn lactic.....	46
3.3.1. Kết quả xác định khả năng chịu axit.....	47
3.3.2. Kết quả xác định khả năng chịu muối mật.....	48
3.3.3. Khả năng sống sót trong dịch dạ dày và dịch ruột giả	
<i>lập</i>.....	49
3.3.4. Khả năng bám dính trên màng nhầy ruột <i>in vitro</i>	51
3.3.5. Kết quả xác định khả năng kháng kháng sinh.....	52
3.3.6. Kết quả kiểm tra khả năng ức chế một số chủng vi sinh vật gây bệnh. 54	
3.3.7. Khả năng sinh axit lactic của 4 chủng vi khuẩn.....	55
3.4. Kết quả nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tạo GABA và sinh khối cao của các chủng vi khuẩn lựa chọn.....	57
3.4.1. Kết quả lựa chọn môi trường	57
3.4.2. Kết quả lựa chọn nhiệt độ nuôi cấy thích hợp.....	60
3.4.3. Kết quả lựa chọn pH nuôi cấy thích hợp.....	61
CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	65
KẾT LUẬN.....	65
KIẾN NGHỊ VÀ ĐỀ XUẤT.....	66

TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	67
Tài liệu tiếng Việt.....	67
Tài liệu tiếng Anh.....	68

PHỤ LỤC

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1: Vi sinh vật phổ biến trong sản xuất probiotic.....	8
Bảng 1.2: Vai trò và chức năng sinh lý của GABA	16
Bảng 2: Mật độ quang phổ (OD 570nm) ở các nồng độ GABA khác nhau....	29
Bảng 3.1.Kết quả sàng lọc khả năng sinh GABA của các chủng vi khuẩn <i>Lactobacillus</i>	40
Bảng 3.2: Khả năng sống sót trong dịch dạ dày và dịch ruột giả lập của 4 chủng vi khuẩn.....	50
Bảng 3.3: Khả năng bám dính trên màng nhầy ruột <i>in vitro</i> của 4 chủng vi khuẩn.....	52
Bảng 3.4:Khả năng kháng kháng sinh của 4 chủng vi khuẩn	53
Bảng 3.5:Khả năng ức chế một số vi sinh vật gây bệnh của 4 chủng vi khuẩn.	54
Bảng 3.6 : Khả năng sinh axit lactic của 4 chủng vi khuẩn	55
Bảng 3.7: Khả năng sinh GABA và sinh trưởng của 4 chủng vi khuẩn trong 4 loại môi trường.....	58
Bảng 3.8: khả năng sinh GABA và sinh trưởng của 4 chủng vi khuẩn khi nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau.....	60
Bảng 3.9: Khả năng sinh GABA và sinh trưởng của 4 chủng vi khuẩn khi nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau.....	62

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1: Minh họa cơ chế tác động của probiotic.....	3
Hình 1.2: Hình ảnh bám dính của nấm men lên bề mặt của E.coli.....	6
Hình 1.3: Cấu trúc phân tử GABA.....	11
Hình 1.4: Mô hình cấu trúc thụ thể GABA _A	13
Hình 1.5: <i>Mô hình cấu trúc của thụ thể GABA_B</i>	13
Hình 1.6: Con đường tổng hợp GABA.....	14
Hình 3.1: Khả năng sinh GABA của các chủng vi khuẩn lactic.....	41
Hình 3.2: Vị trí phân loại của các chủng nghiên cứu với các loài có mối quan hệ họ hàng gần.....	43
Hình 3.3: Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào (B) của chủng VTCC-B-421.....	44
Hình 3.4: Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào (B) của chủng VTCC-B-26.....	44
Hình 3.5: Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào (B) của chủng VTCC-B-31.....	45
Hình 3.6: Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào (B) của chủng VTCC-B-450.....	46
Hình 3.7: Khả năng chịu axit của 4 chủng vi khuẩn.....	48
Hình 3.8: Khả năng chịu muối mật của 4 chủng vi khuẩn.....	49
Hình 3.9: Khả năng chịu kháng sinh của chủng VTCC-B-421(A) và chủng VTCC-B-431(B).....	53
Hình 3.10: Khả năng ức chế <i>Bacillus cereus</i> (A) và <i>Salmonella enterica</i> (B) của 4 chủng vi khuẩn.....	55
Hình 3.11: Con đường chuyển hóa glutamate thành ABA.....	64

BẢNG CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DNA	Deoxyribo nucleic Acid
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GABA	Gamma - aminobutyric acid
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GRAS	Generally Recognized as Safe
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i>
MSG	Monosodium glutamate
MRS	De Man, RoGoSa and Sharbe (Medium for LAB)
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic acid
TLC	Thin layer chromatography
WHO	<i>World Health Organization</i>
OD	Optical Density