

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VÀ NUÔI CẤY VI KHUẨN *Bacillus* sp. ĐỂ SINH TỔNG HỢP ACID γ -AMINO BUTYRIC TRONG NƯỚC CHUA ĐẬU HŨ

Huỳnh Thanh Trúc¹, Dương Thị Yến Nhi¹, Lưu Minh Châu²,

Nguyễn Ngọc Thạch², Bùi Hoàng Đăng Long², Huỳnh Xuân Phong^{2*}

¹Sinh viên ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ

*Email: hxphong@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 08/02/2025; Ngày nhận bài sửa: 10/3/2025; Ngày chấp nhận đăng: 24/3/2025

TÓM TẮT

Acid γ -aminobutyric (GABA) là một acid amin không thuộc nhóm cấu tạo protein, có vai trò quan trọng liên quan đến hoạt động hệ thần kinh của sinh vật. Việc ứng dụng vi sinh vật trong sản xuất GABA từ các phụ phẩm trong quá trình chế biến cũng đang được quan tâm như một phương pháp sản xuất bền vững và hiệu quả. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp GABA và khảo sát điều kiện nuôi cấy như nguồn carbon, nitrogen và pH môi trường phù hợp cho chủng vi khuẩn *Bacillus* đã tuyển chọn trong môi trường nước chua đậu hũ. Kết quả xác định được chủng *Bacillus* sp. HV5 có khả năng sinh tổng hợp GABA cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường nước chua đậu hũ được bổ sung 1% (w/v) tinh bột, 1% (w/v) peptone, 1% (w/v) MSG ở pH 7. Kết quả sau 72 giờ lên men ở nhiệt độ 35 °C trong điều kiện ủ lắc 200 vòng/phút cho hàm lượng GABA đạt $1,288 \pm 0,089$ mg/mL.

Từ khóa: Acid γ -aminobutyric (GABA), *Bacillus* sp., lên men, nước chua đậu hũ, sản xuất GABA.

1. MỞ ĐẦU

Acid γ -aminobutyric (GABA) tồn tại phổ biến trong thực vật, động vật và cả vi sinh vật. GABA hiện nay đang được thu hút với sự quan tâm bởi các nhà khoa học do có đặc tính chức năng sinh học có lợi cho con người và tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau [1]. GABA có thể được sản xuất bằng nhiều phương pháp khác nhau như tổng hợp hóa học, lên men vi sinh vật hay chiết xuất từ các nguyên liệu có sẵn trong tự nhiên. Tuy nhiên, nhu cầu sử dụng GABA từ các nguồn tự nhiên, đặc biệt là từ quá trình lên men sinh học, đang ngày càng tăng do tính an toàn và chi phí thấp hơn so với phương pháp tổng hợp hóa học cũng như chiết xuất từ các nguồn tự nhiên [2].

GABA được hình thành thông qua quá trình sinh tổng hợp bởi một số vi khuẩn và được tổng hợp sinh học bằng cách khử carboxyl của acid L-glutamic nhờ tác động xúc tác của enzyme glutamate decarboxylase (GAD) sử dụng pyridoxal 5'-phosphate (PLP) làm cofactor enzyme [3], [4]. Quá trình tổng hợp GABA của vi khuẩn phụ thuộc chặt chẽ vào enzyme GAD được mã hóa bởi gen *gadA* hoặc *gadB* trong tế bào vi khuẩn. Glutamate được vận chuyển vào tế bào thông qua chất vận chuyển ngược, sau đó xảy ra quá trình khử carboxyl. Cuối cùng, sản phẩm GABA được tiết ra khỏi tế bào bởi chất vận chuyển ngược glutamate/GABA, được mã hóa bởi gen *gadC* [5]. Trên thực tế, không phải tất cả các chủng trong cùng một loài đều có thể sản xuất GABA, vì khả năng này phụ thuộc vào sự hiện diện của các gen chịu trách nhiệm tổng hợp GABA. Trong nhiều loài vi khuẩn, *Bacillus* spp. được xem là ứng viên tiềm năng cho quá trình lên men sinh học sản xuất GABA nhờ khả năng sinh trưởng nhanh, thích nghi điều kiện khắc nghiệt như pH thấp và nồng độ muối cao, đồng thời không yêu cầu môi trường nuôi cấy phức tạp [6]. Quá trình lên men GABA ở quy mô công nghiệp thường bị hạn chế do chi phí cao của nguyên liệu thô ban đầu. Việc ứng dụng thương mại ngày càng tăng của GABA trong nhiều ngành công

nghiệp khác nhau đã thúc đẩy nghiên cứu tìm kiếm các chất nền thay thế cho sản xuất GABA. Năm 2020, Asun et al. đã công bố nghiên cứu sản xuất GABA bằng quá trình lên men *Bacillus subtilis* BBEL02 sử dụng chất thải công nghiệp giàu nitơ làm nguyên liệu thô [7]. Một số nghiên cứu khác đã đề xuất quy trình lên men với *Bacillus* spp. để tối ưu hàm lượng GABA trong Chungkukjang - một sản phẩm đậu nành lên men truyền thống của Hàn Quốc [8]; nước tương moromi [9] hay trong men vi sinh probiotic [10].

Đậu hũ hay tàu hũ là món ăn khá phổ biến được làm từ nguồn nguyên liệu chính là đậu nành. Trong quá trình sản xuất đậu hũ, đậu nành được xay và dịch sữa đậu nành được nấu, quá trình kết tủa nước sữa này để thu hồi phần đậu hũ và ép tách lượng nước dư để giữ lại phần sữa kết tủa để tạo thành đậu hũ. Phần nước được loại bỏ được gọi là nước chua đậu hũ (NCDH). Đây là một loại nước thải dồi dào, với thành phần các chất dinh dưỡng như chất béo, protein, carbohydrate và muối vô cơ [11]. Tuy nhiên, với nồng độ các chất hữu cơ cao, NCDH cũng cho thấy là nguồn gây ô nhiễm môi trường thải ra từ các cơ sở sản xuất nếu không được thu gom và xử lý đúng cách. Do đó, việc xử lý loại nước thải này là rất quan trọng đối với các cơ sở sản xuất thủ công cũng như các nhà máy ở quy mô lớn hơn. Nhận thấy, NCDH rất giàu dinh dưỡng và là một môi trường thay thế tiềm năng cho quá trình lên men. Một số nghiên cứu đã sử dụng NCDH để làm môi trường nuôi cấy các loài vi sinh vật như vi tảo *Schizochytrium* để tăng sản xuất acid docosahexaenoic [12], *Propionibacterium freudenreichii* để sản xuất vitamin B12 [13], *Bacillus subtilis* sản xuất nattokinase [14] và *Lactobacillus plantarum* để sản xuất acid lactic [15]. Nghiên cứu đề cập sử dụng nguồn NCDH như là môi trường nuôi cấy vi sinh vật nói chung và *Bacillus* spp. nói riêng không chỉ góp phần giảm chi phí nguyên liệu mà còn là hướng bền vững trong sản xuất GABA bằng vi sinh vật, qua đó góp phần trong việc giảm thiểu nguồn gây ô nhiễm môi trường từ các quá trình sản xuất.

Từ những vấn đề trên, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tuyển chọn được các chủng vi khuẩn *Bacillus* có tiềm năng sinh GABA và xác định các điều kiện nuôi cấy thích hợp trong môi trường NCDH, qua đó góp phần đề xuất hướng ứng dụng thực tế cho quá trình lên men sản xuất GABA bằng vi sinh vật từ nguồn nguyên liệu tự nhiên.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Bộ giống vi khuẩn *Bacillus* gồm 11 chủng đã được phân lập từ chao. Các chủng vi khuẩn nghiên cứu có hình thái khuẩn lạc không đều, dạng bìa răng cưa hoặc chia thùy và có màu trắng đục hoặc trắng ngà. Tế bào có dạng hình que ngắn hoặc dài, Gram dương, di động, catalase dương tính, oxidase âm tính hoặc dương tính. Các chủng vi khuẩn này được trữ trong glycerol ở -20 °C và bảo quản tại Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ.

Nước chua đậu hũ được thu nhận từ cơ sở sản xuất chao Vĩnh Trân (147/62, Trần Việt Châu, phường Cái Khế, Cần Thơ). NCDH được thu nhận và được lọc qua vải the trước khi sử dụng để loại bỏ cặn đậu hũ, pH ban đầu ghi nhận từ 5,3-5,5. NCDH được trữ lạnh từ 0-4 °C cho đến khi thực hiện thí nghiệm. Hàm lượng thành phần có trong NCDH sau khi phân tích tại Trung tâm Kiểm soát bệnh tật TP. Cần Thơ ghi nhận hàm lượng đường khử là 0,5%, hàm lượng protein (nitơ tổng số) là 0,37%, hàm lượng chất béo lipid là 0,1% và hàm lượng tro tổng số là 0,51%.

Hóa chất: GABA (Merck, Đức), monosodium glutamate (MSG) (Ajinomoto, Việt Nam), n-butanol, acid acetic, CuSO₄.5H₂O, ninhydrin, glycerol 40%, KOH (Xilong Scientific, Trung Quốc), H₂O₂ 30% (Đức Giang, Việt Nam), thuốc thử oxidase (Nam Khoa Biotek, Việt Nam), dung dịch Lugol. Môi trường Nutrient Broth (NB, Merck).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp GABA

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* được nuôi tăng sinh trong 24 giờ sử dụng môi trường NB, ủ lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 35 °C (mật số đạt 10⁸ CFU/mL). Tiếp theo, 100 μL dịch tăng sinh được chuyển vào 9 mL môi trường NB (pH 7) có 1% (w/v) MSG và được ủ lắc trong 72 giờ ở 35 °C. Sau

thời gian nuôi cấy, thực hiện định tính và định lượng hàm lượng GABA hiện diện trong môi trường nuôi cấy. Chúng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp GABA cao nhất được tuyển chọn để khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến hàm lượng GABA trong môi trường NCDH

a. Khảo sát nguồn carbon

Môi trường nuôi cấy được chuẩn bị bằng cách sử dụng NCDH làm môi trường chính, sau đó bổ sung 1% (w/v) nguồn carbon, 1% (w/v) nguồn nitrogen, 1% (w/v) MSG. Giá trị pH của môi trường được điều chỉnh về mức 7 bằng dung dịch NaOH 2 N. Để khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng tổng hợp GABA, ba nguồn carbon khác nhau được thử nghiệm bao gồm glucose, sucrose và tinh bột; nguồn nitrogen được cố định là peptone. Môi trường được khử trùng ở 121 °C trong 20 phút. Tiếp theo, 100 μ L dịch tăng sinh của chủng vi khuẩn được chọn sẽ được chuyển vào 9 mL môi trường NCDH đã được điều chỉnh theo các điều kiện khảo sát. Các ống nghiệm được ủ lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 35 °C trong 72 giờ. Xác định hàm lượng GABA sinh ra trong môi trường khảo sát.

b. Khảo sát nguồn nitrogen

Thí nghiệm được tiến hành tương tự. Tuy nhiên, việc khảo sát được thực hiện với 3 nguồn nitrogen bao gồm tryptone, peptone và NH_4Cl . Nguồn carbon cố định được lựa chọn từ thí nghiệm trước. Cuối cùng, 100 μ L dịch tăng sinh vi khuẩn được chuyển vào 9 mL môi trường NB và ủ trong điều kiện tương tự như trên. Xác định hàm lượng GABA sinh ra trong môi trường khảo sát.

c. Khảo sát pH ban đầu

Tương tự các bước như trên, môi trường nghiên cứu bao gồm NCDH được bổ sung 1% (w/v) MSG, 1% (w/v) nguồn carbon và nguồn nitrogen được chọn từ các thí nghiệm trước. Giá trị pH của môi trường được điều chỉnh các mức 6, 7 và 8 bằng NaOH 2 N. Cuối cùng, 100 μ L dịch tăng sinh vi khuẩn được chuyển vào 9 mL môi trường NB và ủ trong điều kiện tương tự. Xác định hàm lượng GABA sinh ra trong môi trường khảo sát.

2.2.3. Định danh chủng Bacillus có khả năng sinh tổng hợp GABA

Chủng *Bacillus* tuyển chọn có khả năng sinh GABA với hàm lượng cao nhất được xác định tên loài bằng kỹ thuật giải trình tự vùng gen 16S rRNA. Trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn *Bacillus* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1495R (5'-CTACGGCTACCTGTTACGA-3') [16]. Công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) được sử dụng để so sánh mức độ tương đồng của chuỗi trình tự vùng 16S rRNA gene với các trình tự gen đã được xác định và công bố trên NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dựa trên cơ sở dữ liệu đó, có thể xác định tên loài của chủng vi khuẩn đang nghiên cứu.

2.2.4. Phương pháp phân tích chỉ tiêu và xử lý số liệu

GABA được định tính và định lượng bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC) theo mô tả của Li et al. [17]. Đầu tiên, 1 mL dịch lên men được cho vào ống eppendorf, ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ sinh khối vi khuẩn. Phần dịch nổi phía trên được chuyển sang ống eppendorf mới để sử dụng cho phân tích. Tiếp theo, 2 μ L dịch mẫu sau ly tâm được cho lên bản mỏng silica gel (5 \times 10 cm) (đã được kích hoạt bằng cách sấy ở 90 °C trong 30 phút). Các điểm chấm mẫu được đặt cách nhau 1 cm và cách mép dưới của bản sắc ký 1,5 cm. Sau khi chấm, mẫu được để khô trong 3 phút trước khi đặt bản sắc ký vào bể khai triển chứa 20 mL dung môi gồm n-butanol, acid acetic và nước theo tỷ lệ 5:3:2 (v/v), có bổ sung 1,2% (w/v) ninhydrin. Quá trình sắc ký được thực hiện ở nhiệt độ phòng và đảm bảo bản sắc ký được đặt thẳng đứng. Khi dung môi di chuyển cách mép trên bản mỏng 0,5 cm, bản sắc ký được lấy ra và sấy ở 70 °C trong 80 phút để hiển thị các đốm GABA.

- Định tính: Việc xác định sự hiện diện của GABA được thực hiện bằng cách so sánh hệ số di chuyển (R_f) của mẫu với hệ số di chuyển của dung dịch GABA chuẩn (2 mg/mL), trong đó $R_f = a/b$, với a là khoảng cách di chuyển của chất phân tích và b là khoảng cách di chuyển của dung môi, giá trị R_f nằm trong khoảng từ 0 đến 1.

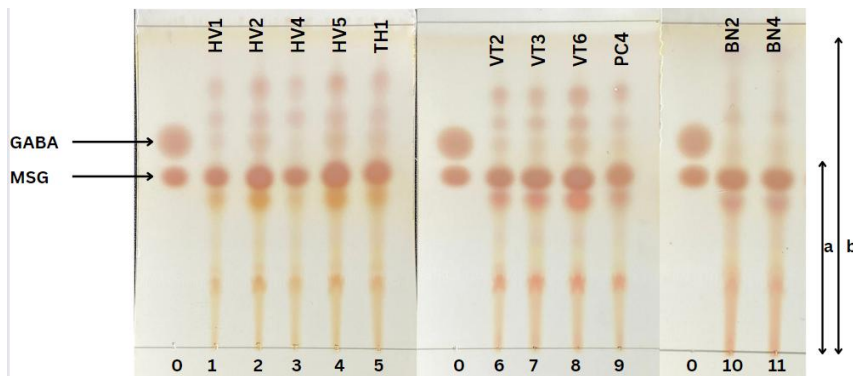
- Định lượng: Các đốm GABA trên bản sắc ký giấy được cắt và chuyển vào ống nghiệm chứa 5 mL dung dịch ethanol 75% và $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,6% theo tỷ lệ 38:2 (v/v). Mẫu được vortex để hòa tan hoàn toàn các đốm GABA. Tiếp theo, độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 512 nm sử dụng máy đo quang phổ UV-Vis (Thermo, Genesis 50). Hàm lượng GABA trong mẫu được tính toán dựa trên đường chuẩn GABA.

Kết quả của các thí nghiệm là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại và trình bày dưới dạng TB (trung bình) \pm ĐLC (độ lệch chuẩn). Số liệu thô được tính toán và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corp., Hoa Kỳ). Kết quả được phân tích phương sai (ANOVA) và thống kê theo phương pháp kiểm định Tukey với mức ý nghĩa 5% bằng phần mềm Minitab 16.2.4.4 (Minitab, LLC., Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp GABA

Mười một chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường NB có bổ sung MSG để khảo sát khả năng sinh tổng hợp GABA. Sau 72 giờ, dịch lên men được phân tích để xác định GABA bằng phương pháp TLC. Hình ảnh kết quả sắc ký định tính GABA của 11 chủng vi khuẩn được thể hiện qua Hình 1. Kết quả cho thấy, trên đường sắc ký của 11 chủng vi khuẩn khảo sát đều xuất hiện đốm ở vị trí tương đồng với đốm GABA chuẩn ($R_f = 0,625$).



Hình 1. Kết quả định tính GABA trong dịch lên men của 11 chủng vi khuẩn khảo sát

Ghi chú: a - Khoảng cách di chuyển của chất phân tích (vị trí 0: hỗn hợp dung dịch GABA (2 mg/mL) và MSG (2 mg/mL)); b - Khoảng cách di chuyển của dung môi sắc ký

Kết quả chứng tỏ cả 11 chủng này đều có khả năng sinh tổng hợp GABA trong môi trường NB khi bổ sung 1% MSG. Tuy nhiên, mức độ đậm nhạt và lớn nhỏ của các đốm này có sự khác nhau khi quan sát bằng mắt thường và để chính xác hơn, hàm lượng GABA có trong dịch lên men cũng được xác định. Kết quả cụ thể được trình bày ở Bảng 1. Mặc dù *Bacillus* là một chi vi khuẩn đa dạng với nhiều loài, nhưng chỉ một số loài hoặc chủng cụ thể có khả năng tổng hợp GABA [12, 13]. Nguyên nhân là do một số chủng thiếu gen cần thiết cho quá trình tổng hợp GABA từ glutamate và putrescine hoặc gen này không được biểu hiện hay hoạt động của các gen cũng có sự khác nhau giữa các chủng do sự khác biệt di truyền [19]. Trong thí nghiệm sàng lọc này, 11 chủng đều có khả năng tổng hợp GABA với hàm lượng đều lớn hơn 0,6 mg/mL. Trong đó, chủng HV2 và HV5 tổng hợp được lượng GABA cao nhất lần lượt là $1,198 \pm 0,029$ mg/mL và $1,211 \pm 0,063$ mg/mL và có khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$) nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 9 chủng còn lại. Riêng chủng HV4 là chủng vi khuẩn sinh tổng hợp GABA với hàm lượng thấp nhất là $0,634 \pm 0,138$ mg/mL. Sự khác biệt về hàm lượng GABA có thể do mỗi chủng vi khuẩn sẽ phù hợp với các yếu tố nuôi cấy khác nhau để sinh trưởng như pH, nhiệt độ, nồng độ MSG bổ sung hoặc thành phần môi trường nuôi cấy do lượng GABA được sinh tổng hợp chủ yếu phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật. Nhìn chung, chủng vi khuẩn HV2 và HV5 là 2 chủng được ghi nhận với hàm lượng GABA cao nhất nên được chọn để tiếp tục thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Kết quả định lượng sàng lọc các chủng vi khuẩn sinh GABA

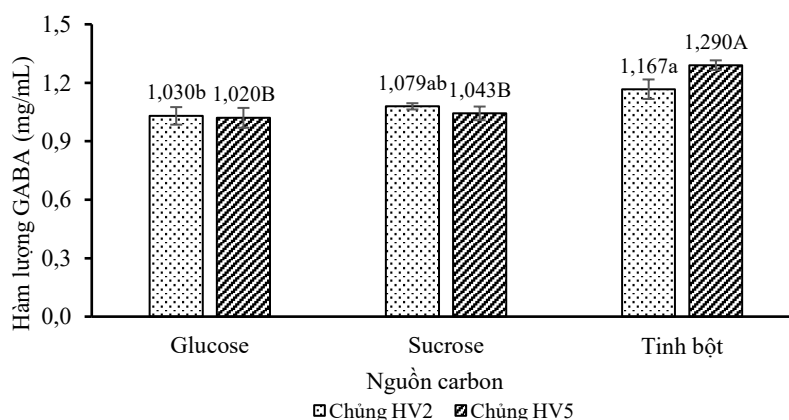
Chủng vi khuẩn	Hàm lượng GABA (mg/mL)
VT2	1,017 \pm 0,016 ^b
VT3	1,004 \pm 0,016 ^{bc}
VT6	0,943 \pm 0,029 ^{bcd}
HV1	0,886 \pm 0,028 ^{bcd}
HV2	1,198 \pm 0,029 ^a
HV4	0,634 \pm 0,138 ^e
HV5	1,211 \pm 0,063 ^a
PC1	0,847 \pm 0,063 ^{bcd}
TH4	0,783 \pm 0,089 ^{de}
BN2	0,837 \pm 0,027 ^{cd}
BN4	0,847 \pm 0,048 ^{bcd}

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.2. Ảnh hưởng các yếu tố nuôi cấy đến hàm lượng GABA trong môi trường NCDH

3.2.1. Kết quả khảo sát nguồn carbon

Hai chủng vi khuẩn HV2 và HV5 được tăng sinh trong môi trường NB, sau đó, được chuyển sang môi trường khảo sát với các nguồn carbon khác nhau. Sau 72 giờ, dịch lên men được sử dụng để kiểm tra hàm lượng GABA. Kết quả hàm lượng GABA của hai chủng vi khuẩn trong các môi trường khảo sát được trình bày ở Hình 2. Kết quả ở Hình 2 cho thấy hai chủng HV5 và HV2 sinh hàm lượng GABA đạt cao nhất trong môi trường NCDH có bổ sung 1% tinh bột với giá trị lần lượt là 1,290 \pm 0,025 mg/mL là 1,167 \pm 0,050 mg/mL. Khi bổ sung nguồn carbon là glucose hoặc sucrose thì hàm lượng GABA sinh ra trong môi trường NCDH thấp hơn và giữa 2 nguồn carbon này có sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê.



Hình 2. Hàm lượng GABA sinh ra bởi 2 chủng vi khuẩn HV2 và HV5 ở các môi trường bổ sung nguồn carbon khác nhau

Ghi chú: Các chữ cái in thường và in hoa khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) về hàm lượng GABA tương ứng đối với chủng HV2 và HV5

Nguồn carbon là yếu tố dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển và lên men của vi sinh vật. Thông thường, các loại đường đơn thường được vi sinh vật ưu tiên sử dụng cho sự phát triển và trao đổi chất của chúng. Trong đó, glucose được biết đến là nguồn carbon được ưa thích nhất cho quá trình lên men

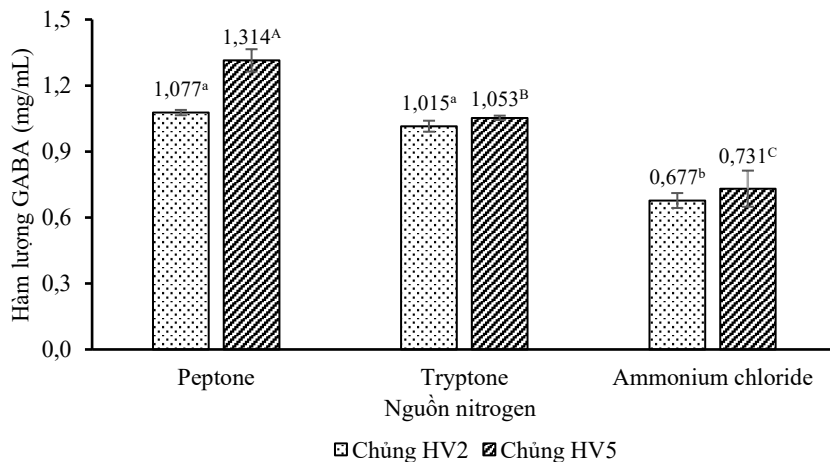
Bacillus spp. [20, 21]. Nghiên cứu của Asun et al. đã xác định môi trường lên men tối ưu để sản xuất GABA bởi *B. subtilis* BBEL02 là glucose với nồng độ 1% (w/v) [7]. Mặt khác, Suwanmanon et al. khi tối ưu hóa nguồn carbon đã cho ra kết quả rằng fructose là nguồn carbon tối ưu để sinh tổng hợp GABA của chủng *B. subtilis* được phân lập từ rơm rạ [12].

Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy tinh bột là nguồn carbon tối ưu cho quá trình tổng hợp GABA của vi khuẩn HV2 và HV5, khác với các nguồn carbon được báo cáo trong các nghiên cứu trước. Sự khác biệt này có thể do cơ chế sử dụng polysaccharide và monosaccharide của vi khuẩn. Với monosaccharide, đường đơn được vận chuyển vào tế bào, phosphoryl hóa và đi vào quá trình đường phân. Tuy nhiên, NCDH chứa sẵn đường khử (0,5% w/v), nên việc bổ sung glucose làm tăng nồng độ đường trong môi trường. Nồng độ glucose cao có thể gây ức chế ngược, dẫn đến giảm sản xuất GABA, tương tự kết quả nghiên cứu của Asun et al., khi năng suất sản xuất GABA của *B. subtilis* BBEL02 giảm khi nồng độ glucose được thêm vào môi trường cơ bản từ 1% lên 5% w/v [7].

Ngược lại, với polysaccharide như tinh bột, vi khuẩn tiết amylase để thủy phân thành đường đơn hoặc đường đôi, sau đó chúng được vận chuyển vào tế bào và tiếp tục phân giải. Cơ chế điều hòa này giúp duy trì nồng độ glucose ổn định, tránh ức chế ngược và tối ưu hóa quá trình sinh trưởng, tổng hợp GABA [22]. Vi khuẩn sử dụng lượng đường khử có sẵn trước, sau đó mới phân giải tinh bột, giúp duy trì tốc độ sinh trưởng và hiệu suất tổng hợp GABA cao hơn. Như vậy, mỗi chủng vi sinh vật thích nghi với nguồn carbon và môi trường lên men khác nhau.

3.2.2. Kết quả khảo sát nguồn nitrogen

Từ kết quả thí nghiệm trên, tinh bột được chọn là nguồn carbon cho các thí nghiệm sau. Ba nguồn nitrogen là peptone, tryptone và NH₄Cl được tiến hành khảo sát. Sau 72 giờ lên men, kết quả hàm lượng GABA được thể hiện ở Hình 3. Kết quả cho thấy ở nghiệm thức với peptone là nguồn nitrogen, cả hai chủng HV2 và HV5 đều sinh tổng hợp lượng GABA cao nhất lần lượt là 1,077 ± 0,012 mg/mL và 1,314 ± 0,051 mg/mL (Hình 3).



Hình 3. Biểu đồ minh họa hàm lượng GABA sinh ra bởi 2 chủng vi khuẩn HV2 và HV5 ở các môi trường bổ sung nguồn nitrogen khác nhau

Ghi chú: Các chữ cái in thường và in hoa khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) về hàm lượng GABA tương ứng đối với chủng HV2 và HV5

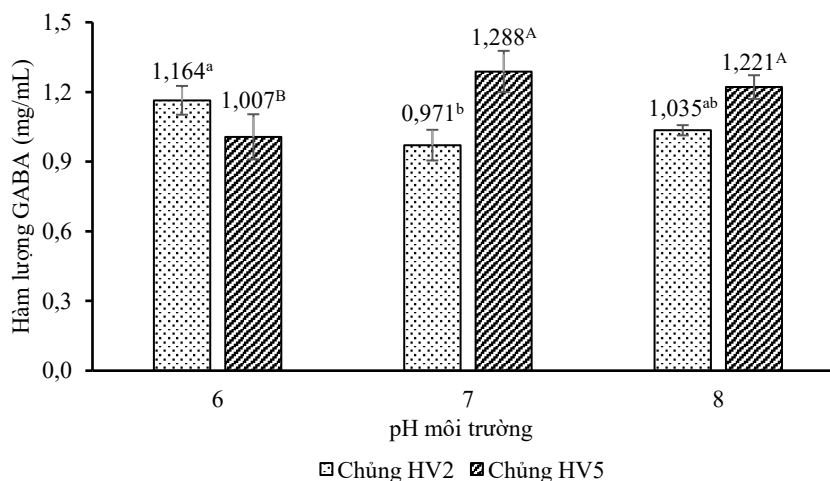
Đối với chủng HV2 thì hàm lượng GABA trong môi trường bổ sung peptone và tryptone có sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Riêng chủng HV5 thì hàm lượng GABA trong môi trường bổ sung peptone cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê với hàm lượng GABA môi trường bổ sung tryptone. Mặt khác, lượng GABA sinh tổng hợp bởi hai chủng đều thấp hơn đáng kể khi lên men trong môi trường chứa NH₄Cl, lượng GABA của chủng HV2 thấp hơn 37,14% so với môi trường bổ sung peptone (1,077 ± 0,012 mg/mL) và chủng HV5 cũng giảm 58,30% so với môi trường bổ sung peptone (1,314 ± 0,051 mg/mL). Kết quả chứng tỏ rằng hai chủng vi khuẩn này thích hợp với nguồn nitrogen hữu cơ hơn nguồn nitrogen vô cơ.

Bên cạnh carbon, nitrogen là yếu tố thiết yếu để vi sinh vật tổng hợp acid amin, hỗ trợ sinh trưởng và sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp như GABA. Fisher và Sonenshein (1991) đã chứng minh rằng *B. subtilis* có thể sử dụng cả nitrogen hữu cơ và vô cơ, nhưng sinh trưởng tốt hơn với nguồn nitrogen hữu cơ [23]. Điều này là do nitrogen hữu cơ có tính khả dụng sinh học cao hơn, chủ yếu ở dạng acid amin, là đơn vị cấu trúc cơ bản của protein. Nước chua đậu hũ (NCĐH) chứa một lượng protein nhất định (~0,37%), với 20 loại acid amin đã được xác định, trong đó acid L-glutamic chiếm 14,36%, đóng vai trò tiền chất quan trọng cho quá trình tổng hợp GABA [24]. Tuy nhiên, do NCĐH là phụ phẩm, cần bổ sung thêm nitrogen để tăng hiệu suất sản xuất GABA của vi khuẩn *Bacillus*.

Ngược lại, nếu sử dụng ammonium (NH_4^+) làm nguồn nitrogen, vi khuẩn phải tiêu tốn ATP để điều chỉnh pH nội bào và chuyển hóa thành glutamate hoặc glutamine trước khi tham gia tổng hợp GABA. Hơn nữa, quá trình hấp thụ nitrogen vô cơ bị kiểm soát bởi các protein điều hòa nhạy cảm với nitrogen hữu cơ, làm giảm hiệu quả sử dụng [25, 26]. Kết quả nghiên cứu nguồn nitrogen thích hợp của đề tài này cũng tương đồng với nghiên cứu của Wang et al., ghi nhận peptone là nguồn nitrogen phù hợp nhất để vi khuẩn *B. subtilis* sản sinh GABA [10]. Từ kết quả và so sánh trên, peptone là nguồn nitrogen được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Kết quả khảo sát pH ban đầu

Sử dụng các yếu tố khảo sát tốt nhất của các thí nghiệm trước, tiến hành khảo sát pH môi trường phù hợp với hai chủng vi khuẩn HV2 và HV5. Kết quả hàm lượng GABA sinh ra bởi hai chủng vi khuẩn trong môi trường pH 6, 7 và 8 được thể hiện ở Hình 4. Có thể thấy cả hai chủng HV2 và HV5 đều có khả năng sinh tổng hợp GABA ở các điều kiện pH khác nhau. Chủng vi khuẩn HV5 có thể sinh tổng hợp lượng GABA cao nhất ở cả pH 7 và pH 8 lần lượt là $1,288 \pm 0,089$ mg/mL và $1,221 \pm 0,051$ mg/mL, riêng đối với chủng vi khuẩn HV2 lại đạt lượng GABA cao nhất là $1,164 \pm 0,062$ mg/mL ở pH 6.



Hình 4. Biểu đồ minh họa hàm lượng GABA sinh ra bởi 2 chủng vi khuẩn HV2 và HV5 ở các môi trường có pH ban đầu khác nhau

Ghi chú: Các chữ cái in thường và in hoa khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) về hàm lượng GABA tương ứng đối với chủng HV2 và HV5

Các nghiên cứu trước đây cho thấy pH là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình sản xuất GABA vì nó ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme, cụ thể là enzyme glutamate decarboxylase (GAD) [27]. Enzyme GAD chỉ hoạt động tốt trong một phạm vi pH cụ thể và do đó pH trong phạm vi này sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc sản xuất GABA hiệu quả. Tuy nhiên, việc sản xuất GABA cũng phụ thuộc vào chủng vi khuẩn *Bacillus* và sự sinh trưởng của chúng. Bởi vì giá trị pH tối ưu cho sự phát triển của *B. subtilis* và hoạt động GAD của nó là khác nhau nên cần có độ pH phù hợp cho cả sự phát triển của tế bào và quá trình chuyển hóa sinh học [1].

Thông thường, sản xuất GABA thường được tiến hành trong điều kiện pH có tính acid nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,0, tùy thuộc vào loại vi sinh vật và các đặc tính khác nhau của GAD [28]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chủng HV2 cho hàm lượng GABA cao nhất khi môi trường ban đầu đạt

pH 6. Mặt khác, chủng HV5 lại ghi nhận hàm lượng GABA cao nhất ở pH 7 (Hình 4). Kết quả này phù hợp với kết quả trong nghiên cứu của Wan-Mohtar et al. khi xác định độ pH thích hợp để sản xuất GABA cao trong nước tương bởi chủng *B. cereus* KBC là 7,0 [9]. Nghiên cứu của Suwanmanon và Hsieh cũng đã xác định môi trường ở pH 7 thu được hàm lượng GABA cao nhất từ *B. subtilis* B060 khi khảo sát pH ở các giá trị 6, 7, 8 và 9 [18]. Nhìn chung, mỗi chủng vi sinh vật hay giữa các chủng trong cùng một loài sẽ có những khoảng pH thích hợp để sinh trưởng và thực hiện các phản ứng chuyển hóa thứ cấp. Qua các kết quả khảo sát, pH 7 là pH thích hợp để chủng vi khuẩn HV5 sinh tổng hợp GABA trong môi trường NCDH và chủng này được chọn để định danh.

3.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn HV5

Do chủng HV5 là chủng vi khuẩn có năng khả sinh tổng hợp GABA cao nhất trong môi trường NCDH nên được định danh để xác định tên loài. Công cụ Nucleotide BLAST được sử dụng để so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng HV5 với các trình tự vi khuẩn trong cơ sở dữ liệu của NCBI và kết quả tra cứu được thể hiện ở Hình 5.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillus methylotrophicus strain LD34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1691	1691	98%	0.0	100.00%	1460	KR855694.1
Bacillus sp. (in: firmicutes) strain PGM774 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	1693	1693	99%	0.0	99.89%	1454	OQ876224.1
Bacillus velezensis strain 34-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1693	1693	99%	0.0	99.89%	1458	PP325775.1
Bacillus sp. (in: firmicutes) strain PGM759 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	1690	1690	99%	0.0	99.89%	1459	OQ876209.1
Bacillus sp. (in: firmicutes) strain PGM787 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	1690	1690	98%	0.0	99.89%	1454	OQ876237.1
Bacillus amyloliquefaciens strain AB2013062 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus amyloliquefaciens	1690	1690	98%	0.0	99.89%	1461	PP236941.1
Bacillus amyloliquefaciens strain CAU X1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus amyloliquefaciens	1690	1690	98%	0.0	99.89%	1446	OQ561751.1
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain K17-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1690	1690	98%	0.0	99.89%	1452	JF460753.1
Bacillus amyloliquefaciens strain WSM-KSU301 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1690	1690	98%	0.0	99.89%	1475	HM753630.1

Hình 5. Kết quả so sánh trình tự của chủng HV5 trên NCBI

Kết quả cho thấy chủng HV5 có độ tương đồng cao nhất với loài *Bacillus methylotrophicus* ở mức 100% và có độ tương đồng 99,89% với trình tự của các loài vi khuẩn *B. velezensis* và *B. amyloliquefaciens*. Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu của Zhou et al., *B. velezensis* có kết quả âm tính với thử nghiệm sử dụng citrate, trong khi đó chủng HV5 có thể sử dụng và phát triển trên môi trường citrate [29]. Do đó, chủng HV5 không thuộc loài vi khuẩn này. Mặt khác, cho đến thời điểm hiện tại, chưa có công bố nào liên quan đến loài *B. methylotrophicus* có khả năng tổng hợp GABA. Loài này hoạt động theo cách không phụ thuộc vào glutamate, nhưng có khả năng sản xuất poly (γ -glutamic acid) (γ -PGA) và có thể chủng này cũng khả năng tổng hợp GABA. Tuy nhiên, các chi tiết cụ thể về quá trình tổng hợp GABA trực tiếp của vi khuẩn này còn hạn chế và không được báo cáo đầy đủ trong các công bố hiện tại [30]. Ngược lại, loài *B. amyloliquefaciens* đã được công bố trong nhiều nghiên cứu với khả năng sinh tổng hợp GABA. Trong một nghiên cứu của Zayabaatar et al., *B. amyloliquefaciens* EH-9 đã được nuôi cấy đồng thời với hạt lúa nảy mầm và dịch trong thu được rất giàu GABA [31] hay Huang et al. đã sử dụng *B. amyloliquefaciens* để sản xuất gạo giàu GABA bằng cách chủng vi khuẩn vào hạt ngũ cốc [32]. Do đó, cần thực hiện thêm các thử nghiệm sinh hóa đặc trưng khác có thể phân biệt các loài tương đồng và thực hiện giải trình tự bộ gen để xác định một cách chính xác hơn tên loài của chủng vi khuẩn tiềm năng này.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. HV5 có khả năng sinh tổng hợp GABA và xác định được điều kiện nuôi cấy như nguồn carbon, nguồn nitrogen và pH của môi trường thích hợp trong môi trường nước chua đậu hũ. Hàm lượng GABA cao nhất là $1,288 \pm 0,089$ mg/mL trong môi trường nước chua đậu hũ được bổ sung 1% (w/v) tinh bột, 1% (w/v) peptone, 1% (w/v) MSG ở pH 7 sau 72 giờ lên men trong điều kiện nuôi lắc 200 vòng/phút ở 35 °C. Kết quả cho

thấy tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. HV5 cũng như môi trường nước chua tàu hủ để làm nguồn cơ chất rẻ tiền trong nuôi cấy và thu nhận GABA. Nghiên cứu này đặt nền tảng cho các nghiên cứu tiếp theo về tác động của các yếu tố môi trường khác nhằm nâng cao hiệu suất tổng hợp GABA, đồng thời tối ưu hóa quy trình lên men từ nguồn nguyên liệu rẻ tiền để giảm chi phí sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. Dhakal, V. K. Bajpai, and K. H. Baek, "Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review", *Braz J Microbiol*, vol. 43, no. 4, pp. 1230–1241, 2012, doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400001>
- [2] M. Diana, J. Quílez, and M. Rafecas, "Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review", *J Funct Foods*, vol. 10, pp. 407–420, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.004>
- [3] K. B. Park and S. H. Oh S. H., "Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3", *Bioresour Technol*, vol. 98, no. 2, pp. 312–319, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.004>
- [4] G. Fenalti, R. H. P. Law, A. M. Buckle, *et al.*, "GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop", *Nat Struct Mol Biol*, vol. 14, no., pp. 280–286, 2007, doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb1228>
- [5] Ma D., Lu P., Yan C., *et al.*, "Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter", *Nature*, vol. 483, no. 7391, pp. 632–636, 2012, doi: <https://doi.org/10.1038/nature10917>
- [6] S. B. Crivelli, C. Cundon, M. P. Bonino, *et al.*, "The complex and changing genus *Bacillus*: A diverse bacterial powerhouse for many applications", *Bacteria*, vol. 3, no. 3, pp. 256–270, 2024, doi: <https://doi.org/10.3390/bacteria3030017>
- [7] A. C. Asun, S. T. Lin, H. S. Ng, *et al.* "Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Bacillus subtilis* BBEL02 fermentation using nitrogen-rich industrial wastes as crude feedstocks", *Biochem Eng J*, vol. 187, Art. no. 108654, 2022.
- [8] K. B. Park and S. H. Oh, "Enhancement of γ -aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*", *Biotechnol Lett*, vol. 28, no. 18, pp. 1459–1463, 2006, doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9112-9>
- [9] W. A. A. Q. I. Wan-Mohtar, M. N. A. Soheidein, M. F. Ibrahim, *et al.*, "Isolation, identification, and optimization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing *Bacillus cereus* strain KBC from a commercial soy sauce moromi in submerged-liquid fermentation", *Processes*, vol. 8, no. 6, Art. no. 652, 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/pr8060652>
- [10] Wang H., Huang J., Sun L., *et al.*, "An efficient process for co-production of γ -aminobutyric acid and probiotic *Bacillus subtilis* cells", *Food Sci Biotechnol*, vol. 28, pp. 155–163, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0461-7>
- [11] J. Y. Chua and S. Q. Liu. "Soy whey: More than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry", *Trends Food Sci Technol*, vol. 91, pp. 24–32, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.016>
- [12] S. K. Wang, Y. T. Tian, Y. R. Dai, *et al.*, "Development of an alternative medium via completely replaces the medium components by mixed wastewater and crude glycerol for efficient production of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp.", *Chemosphere*, vol. 291, Art. no. 132868, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132868>
- [13] Y. Yu, X. Zhu, Y. Shen, *et al.*, "Enhancing the vitamin B12 production and growth of *Propionibacterium freudenreichii* in tofu wastewater via a light-induced vitamin B12 riboswitch", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 99, no. 24, pp. 10481–10488, 2015, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6958-6>

- [14] T. Li, C. Zhan, G. Guo, *et al.*, "Tofu processing wastewater as a low-cost substrate for high activity nattokinase production using *Bacillus subtilis*", *BMC Biotechnol*, vol. 21, no. 1, Art. no. 57, 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00719-1>
- [15] L. M. Châu, T. T. T. Nguyễn, L. T. Duyên, *et al.*, "Ứng dụng vi khuẩn lactic trong sản xuất thử nghiệm nước tẩy rửa sinh học từ nước chua tàu hủ", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, vol. 225, no. 08, pp. 222–229, 2020.
- [16] L. Palkova, A. Tomova, G. Repiska, G., *et al.*, "Evaluation of 16S rRNA primer sets for characterisation of microbiota in paediatric patients with autism spectrum disorder", *Sci Rep*, vol. 11, Art. no. 6781, 2021, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86378-w>
- [17] H. Li, T. Qiu, Y. Cao, *et al.*, "Pre-staining paper chromatography method for quantification of γ -aminobutyric acid", *J Chromatogr A*, vol. 1216, no. 25, pp. 5057–5060, 2009.
- [18] K. Suwanmanon and P. C. Hsieh, "Isolating *Bacillus subtilis* and optimizing its fermentative medium for GABA and nattokinase production", *CyTA J Food*, vol. 12, no. 3, pp. 282–290, 2014. doi: <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.848472>
- [19] D. Gao, K. Chang, G. Ding, *et al.*, "Genomic insights into a robust gamma-aminobutyric acid-producer *Lactobacillus brevis* CD0817", *AMB Expr*, vol. 9, no. 1, Art. no. 72, 2019, doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0799-0>
- [20] J. Stülke and W. Hillen, "Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species", *Annu Rev Microbiol*, vol. 54, pp. 849–880, 2000, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.849>
- [21] Y. Fujita, "Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*", *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 73, no. 2, pp. 245–259, 2009, doi: <https://doi.org/10.1271/bbb.80479>
- [22] K. D. Singh, M. H. Schmalisch, J. Stülke, *et al.*, "Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources", *J Bacteriol*, vol. 190, no. 21, pp. 7275–7284, 2008, doi: <https://doi.org/10.1128/jb.00848-08>
- [23] S. H. Fisher and A. L. Sonenshein, "Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*", *Annu Rev Microbiol*, vol. 45, pp. 107–135, 1991.
- [24] H. Fathana, M. Iqhrammullah, R. Rahmi, *et al.*, "Tofu wastewater-derived amino acids identification using LC-MS/MS and their uses in the modification of chitosan/TiO₂ film composite", *Chem Data Collect*, vol. 35, Art. no. 100754, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2021.100754>
- [25] J. Li, W. Tao, S. Yue, *et al.*, "Adaptive laboratory evolution of *Bacillus subtilis* 168 for efficient production of surfactin using NH₄Cl as a nitrogen source", *Fermentation*, vol. 9, no. 6, Art. no. 525, 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation9060525>
- [26] H. He, Y. Li, L. Zhang, *et al.*, "Understanding and application of *Bacillus* nitrogen regulation: A synthetic biology perspective", *J Adv Res*, vol. 49, pp. 1–14, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.09.003>
- [27] Y. Cui, K. Miao, S. Niyaphorn, *et al.*, "Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review", *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 3, Art. no. 995, 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21030995>
- [28] S. Sharafi, L. Nateghi, and S. Yousefi, "Investigating the effect of pH, different concentrations of glutamate acid and salt on production in low-fat probiotic cheese", *Iranian J Microbiol*, vol. 13, no. 3, pp. 389–398, 2021, doi: <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i3.6402>
- [29] J. Zhou, Y. Xie, Y. Liao, *et al.*, "Characterization of a *Bacillus velezensis* strain isolated from *Bolbostemmatis Rhizoma* displaying strong antagonistic activities against a variety of rice pathogens", *Front Microbiol*, vol. 13, Art. no. 983781, 2022, doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983781>
- [30] Y. Peng, T. Zhang, W. Mu, *et al.*, "Intracellular synthesis of glutamic acid in *Bacillus methylotrophicus* SK19.001, a glutamate-independent poly(γ -glutamic acid)-producing strain", *J Sci Food Agr*, vol. 96, no. 1, pp. 66–72, 2016, doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7318>

- [31] E. Zayabaatar, C. M. Huang, M. T. Pham, *et al.*, "*Bacillus amyloliquefaciens* Increases the GABA in rice seed for upregulation of type I collagen in the skin", *Curr Microbiol*, vol. 80, no. 4, Art. no. 128, 2023, doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03233-z>
- [32] C. J. Huang, E. Zayabaatar, S. M. Wang, *et al.*, "*Bacillus amyloliquefaciens*-inoculated GABA-rich rice upregulate neuropeptide Y to relieve psychological stress through mediations of GABAB receptor and vagus nerves", *Biol Bull Russ Acad Sci*, vol. 50, no. 2, pp. 186–193, 2023, doi: <https://doi.org/10.1134/S1062359022700054>

ABSTRACT

STUDY ON SELECTION AND CULTIVATION OF *Bacillus* sp. FOR GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID SYNTHESIS IN TOFU SOUR LIQUID

Huynh Thanh Truc¹, Duong Thi Yen Nhi¹, Luu Minh Chau², Nguyen Ngoc Thanh²,
Bui Hoang Dang Long², Huynh Xuan Phong^{2*}

¹*Undergraduate student in Biotechnology program, University of Science,
National University Ho Chi Minh City, Viet Nam*

²*Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University*

*Email: hxphong@ctu.edu.vn

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid that plays an important role in the nervous system of organisms. The application of microorganisms to produce GABA from by-products is also considered a sustainable and effective production method. The study was conducted to select *Bacillus* strains capable of synthesizing GABA and to investigate the culture conditions, such as the carbon source, nitrogen source, and pH of the environment suitable for the selected *Bacillus* strains in the liquid waste of tofu. The results indicate that *Bacillus* sp. HV5 had the highest GABA biosynthesis ability in liquid waste of tofu when supplemented with 1% (w/v) starch, 1% (w/v) peptone, and 1% (w/v) MSG, pH 7. After 72 h of fermentation under shaking at 200 rpm at 35 °C, the GABA content reached 1.288 ± 0.089 mg/mL.

Keywords: Gamma-aminobutyric acid (GABA), *Bacillus* sp., fermentation, tofu sour liquid, GABA production.