

## Nghiên cứu độ ổn định về hàm lượng và hoạt tính sinh học của chế phẩm chứa *Bacillus subtilis*, quercetin trong điều kiện thực nghiệm

Nghiêm Ngọc Hoa\*, Nguyễn Hà Trung, Lê Huy Hoàng

Viện Công nghệ mới, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự.

\*Email: nghiemnngochoa@gmail.com

Nhận bài: 08/9/2023; Hoàn thiện: 05/11/2023; Chấp nhận đăng: 15/11/2023; Xuất bản: 10/12/2023.

DOI: <https://doi.org/10.54939/1859-1043.j.mst.FEE.2023.264-270>

### TÓM TẮT

Hiệu quả của một chế phẩm sinh học phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là mật độ vi khuẩn trong chế phẩm. Trong thời hạn sử dụng, điều kiện bảo quản không được ảnh hưởng bất lợi, làm giảm số lượng bào tử vì sẽ ảnh hưởng tới hiệu quả sản phẩm. Nghiên cứu này xác định độ ổn định về hàm lượng quercetin (mg), mật độ bào tử *Bacillus subtilis* (CFU/g) và hoạt tính chống oxy hóa DPPH (%), hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm sinh học trong thời gian bảo quản. Kết quả thu được cho thấy sau thời gian bảo quản ở nhiệt độ thường 30°C, hàm lượng quercetin trong chế phẩm được duy trì ở  $44,74 \pm 0,15$  mg/g, mật độ *Bacillus subtilis* khoảng  $5,32 \times 10^6$  CFU/g. Chế phẩm trong thời gian bảo quản thể hiện hoạt tính chống oxy hóa với khả năng trung hòa DPPH > 60% và có hoạt tính kháng các vi khuẩn kiểm định *E. coli*, *Salmonella* trong điều kiện thực nghiệm.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*; DPPH; Quercetin.

### 1. MỞ ĐẦU

Trong lĩnh vực thực phẩm bảo vệ sức khỏe, chế phẩm sinh học được tạo thành với hai thành phần chủ yếu là chất xơ (prebiotic) và men vi sinh (probiotic). Trong đó, probiotic có hiệu quả duy trì sự cân bằng của hệ vi sinh vật đường ruột. *Bacillus subtilis* được sử dụng trong nhiều loại men vi sinh. Các chủng lợi khuẩn *Bacillus* trong probiotics có khả năng tạo dạng bào tử hình cầu (dạng không hoạt động với lớp bảo vệ bên ngoài), vì thế, có thể sống sót đi qua dạ dày của con người để đi tới đường ruột và phát huy tác dụng. Bên cạnh đó, quercetin được biết đến như một chất có hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn mạnh. Chế phẩm sinh học chứa *B. subtilis* và quercetin giúp tăng hiệu quả chống oxy hóa, cải thiện hệ vi sinh đường ruột, nâng cao hiệu quả bảo vệ sức khỏe. Do chế phẩm sinh học chứa probiotic có thành phần chính là các vi sinh vật nên chất lượng sản phẩm, cụ thể là số lượng vi sinh vật bị ảnh hưởng của nhiều yếu tố trong cả ba giai đoạn: sản xuất, bảo quản và sử dụng. Nghiên cứu độ ổn định nhằm bảo đảm sản phẩm luôn đáp ứng tiêu chuẩn chất lượng khi được bảo quản ở điều kiện xác định theo khuyến cáo. Phương pháp nghiên cứu xác định tuổi thọ và điều kiện bảo quản của chế phẩm gồm thử nghiệm cấp tốc và theo dõi dài hạn. Lão hóa cấp tốc là phương pháp được sử dụng rộng rãi trong dự đoán độ ổn định và ước tính thời hạn sử dụng của các chế phẩm vi khuẩn [1, 4]. Tại Việt Nam chưa có nhiều công trình nghiên cứu về độ ổn định của chế phẩm probiotic, đặc biệt với chủng vi khuẩn *B. subtilis*. Trong nghiên cứu trước đó, chúng tôi đã chế tạo được chế phẩm sinh học chứa *Bacillus subtilis*, quercetin trên nền chất xơ và các tá dược khác với mật độ vi khuẩn đạt  $6,8 \times 10^7$  CFU/g, hàm lượng quercetin đạt  $50 \pm 0,05$  mg/g. Chế phẩm có khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xác định độ ổn định của chế phẩm về mật độ vi khuẩn và hàm lượng quercetin ở điều kiện lão hóa cấp tốc và điều kiện bảo quản dài hạn, từ đó đánh giá hoạt tính sinh học của chế phẩm trong điều kiện thực nghiệm.

### 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### 2.1. Nguyên liệu

Chế phẩm chứa vi khuẩn *Bacillus subtilis* VTCC 51 với mật độ bào tử đạt  $6,8 \times 10^7$  CFU/g,

hàm lượng quercetin đạt  $50 \pm 0,05$  mg/g là sản phẩm của đề tài đã nghiên cứu trước đó [2] được lưu trữ ở nhiệt độ phòng ( $30 \pm 2$  °C).

## **2.2. Hoá chất**

- Môi trường LB: peptone 10 g/L, cao nấm men 5 g/L, NaCl 5 g/L, nước cất vừa đủ 1 lít.
- Môi trường DSM: pepton 5 g/L, cao nấm men 3 g/L, KCl 3 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,25 g/L, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1M 1 mL, MnCl<sub>2</sub> 1M 1 mL, FeSO<sub>4</sub> 10mM 100 µL, nước cất vừa đủ 1 lít.
- Hóa chất phân tích quercetin: methanol, ethanol tuyệt đối, quercetin chuẩn (Merck).
- Hóa chất phân tích khả năng chống oxi hóa bằng DPPH: axit ascorbic, dimethyl sulfoxyd (DMSO), Ethanol, DPPH (2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl),...
- Chủng vi khuẩn kiểm định *Salmonella typhi* ATCC 10428, *Escherichia. coli* ATCC 25922 được cung cấp từ bộ môn Thực vật, khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

## **2.3. Thiết bị**

Tủ ấm nuôi cấy vi khuẩn Memmert của Đức, máy lắc ổn nhiệt Thermolyme của Mỹ, máy quang phổ Dynamica của Thụy Sĩ, tủ cấy vô trùng Laminar của Pháp, tủ sấy Memmert của Đức, nồi khử trùng Autoclave của Đài Loan, máy ly tâm lạnh 1,5/2 ml Sigma của Mỹ, tủ vi khí hậu Memmert của Đức,... tại phòng thí nghiệm Công nghệ Hóa sinh/Viện Công nghệ mới.

## **2.4. Phương pháp, kỹ thuật nghiên cứu**

### **2.4.1. Đánh giá độ ổn định của chế phẩm bằng phương pháp lão hóa cấp tốc**

Phương pháp được tiếp cận theo hướng dẫn của ASEAN [9]: điều kiện thử nghiệm  $40 \pm 2$  °C, độ ẩm tương đối  $75 \pm 5\%$ . Độ ổn định của chế phẩm được theo dõi ở các mốc thời gian 0, 3, 6 tháng thông qua 03 chỉ tiêu: Hàm lượng quercetin (mg/g), mật độ bào tử *B. subtilis* (CFU/g), hoạt tính sinh học của chế phẩm.

### **2.4.2. Đánh giá độ ổn định của chế phẩm bằng phương pháp theo dõi dài hạn**

Chế phẩm được theo dõi độ ổn định trong 12 tháng ở điều kiện nhiệt độ  $30 \pm 2$  °C, độ ẩm tương đối  $60 \pm 5\%$ . Chế phẩm được kiểm tra về hàm lượng quercetin, nồng độ vi sinh vật và hoạt tính sinh học qua các mốc thời gian: 0, 3, 6, 9, 12 tháng.

### **2.4.3. Xác định hàm lượng quercetin**

Hàm lượng quercetin được xác định theo phương pháp UV-VIS được mô tả theo Nguyễn Thị Kim Liên và cộng sự có cải biến [7]. Dụng cụ chuẩn quercetin ở các dải nồng độ 2, 3, 5, 8, 10, 15, 30 µg/ml. Chế phẩm được chuẩn bị ở nồng độ 1 mg/ml. Hút 500 µl dung dịch mẫu chế phẩm định mức bằng ethanol tới 5ml ta được mẫu cần đo. Dựa trên phương trình đường chuẩn đã lập xác định hàm lượng quercetin có trong chế phẩm theo công thức (1):

$$F = k.(C.V)/m \quad (1)$$

Trong đó: F - Hàm lượng quercetin (mg/g); k - Hệ số pha loãng; C - Nồng độ quercetin từ đường chuẩn (mg/ml); V - Thể tích dịch chiết thu được (ml); m - Khối lượng mẫu có trong thể tích (V).

### **2.4.4. Xác định mật độ vi khuẩn [6]**

Pha loãng chế phẩm với nước cất khử trùng thành dãy các nồng độ thập phân  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,... Trải 50 - 100 µL dịch pha loãng ở nồng độ  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  lên đĩa thạch LB, ủ ở 37 °C, 48 h. Đếm số khuẩn lạc trên các đĩa có 30 - 300 khuẩn lạc. Mỗi nồng độ pha loãng lặp lại 3 lần. Xác định số tế bào vi khuẩn trên 1g mẫu theo công thức (2):

$$N = A \times 1/K \times 1/V \quad (2)$$

Trong đó: N - Số lượng tế bào VSV trong 1 g mẫu; A - Số khuẩn lạc trung bình ở một nồng độ pha loãng; K - Độ pha loãng của mẫu; V - Thể tích dịch mẫu đem trải, ml.

2.4.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa qua khả năng cho hydro

Xác định khả năng kháng oxy hóa (bắt gốc DPPH) [8]: Hòa tan DPPH trong methanol đạt nồng độ 0,25 μM. 1 g chế phẩm được hòa trong methanol ở các nồng độ pha loãng khác nhau. 1 mL DPPH được bổ sung vào các ống có sẵn mẫu dịch chế phẩm. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37 °C trong 30 phút. Xác định độ hấp thụ quang của dung dịch sau phản ứng ở bước sóng 517 nm. Ống có dung môi và dung dịch DPPH được xem là mẫu đối chứng. Khả năng trung hòa gốc tự do (A) sinh ra từ DPPH của mẫu thử được tính theo công thức (3):

$$A (\%) = [1 - (A_s - A_0)/A_c] \times 100 \quad (3)$$

Trong đó:  $A_s$  - Độ hấp thụ của mẫu cùng với DPPH;  $A_0$  - Độ hấp thụ của mẫu mà không có DPPH;  $A_c$  - Độ hấp thụ của DPPH với mẫu đối chứng.

2.4.6. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm

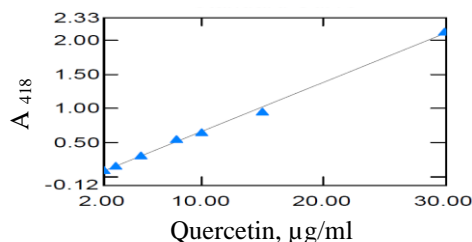
Hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch theo mô tả của Jaisinghani và cộng sự [5]. Các vi khuẩn kiểm định *E. coli*, *S. typhi* được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng và nuôi cấy dịch huyền phù vi khuẩn cho đến khi đạt OD<sub>600</sub> bằng 0,8. Tiếp theo, 100 μL dịch vi khuẩn được trải đều lên bề mặt đĩa thạch, sau đó, đĩa thạch được để khô 15 phút. Đặt 5 khoanh giấy vô trùng đường kính 6mm lên mặt đĩa thạch theo vị trí đánh dấu. Sau đó, hút 20 μL dung dịch pha loãng chế phẩm trong DMSO ở nồng độ 1 mg/mL, 5 mg/mL và 10 mg/mL vào khoanh giấy. 20 μL kháng sinh Ciprofloxacin ở nồng độ 5 μg/mL được sử dụng là đối chứng dương và 20 μL DMSO được sử dụng là đối chứng âm. Các đĩa được để ở nhiệt độ phòng 30 phút cho các chất được khuếch tán, sau đó, ủ các đĩa trong tủ ấm 37 °C. Sau 24 giờ, quan sát và đo kích thước vòng kháng khuẩn bằng thước đo.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định độ ổn định của chế phẩm bằng phương pháp lão hóa cấp tốc

3.1.1. Xác định hàm lượng quercetin bằng phương pháp lão hóa cấp tốc

Kết quả xác định đường chuẩn quercetin được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Đường chuẩn quercetin.

Đường chuẩn có phương trình  $y = 0,0719505x - 0,0568987$

Kết quả định lượng hàm lượng quercetin trong mẫu chế phẩm được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng quercetin theo thời gian bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc.

STT	Thời gian (tháng)	Tên mẫu	Hàm lượng quercetin trung bình trong chế phẩm (mg/g)	Hàm lượng quercetin còn lại trong chế phẩm (%)	Tuổi thọ ước tính ở điều kiện thử nghiệm (tháng)	Tuổi thọ ước tính ở điều kiện thường (tháng)
1	0	Q1	50,648	100		
2		Q2	50,542			
3		Q3	49,741			
4	3	Q4	48,277	94,58		

**Nghiên cứu khoa học công nghệ**

5	6	Q5	47,795	90,63	6,6	13,2
6		Q6	46,627			
7		Q7	45,675			
8		Q8	44,284			
9		Q9	46,831			

Nhận xét: Tuổi thọ của sản phẩm được xác định khi hàm lượng dược chất trong chế phẩm lớn hơn hoặc bằng 90% so với hàm lượng ban đầu. Kết quả của bảng 1 cho thấy sau 6 tháng ở điều kiện lão hóa cấp tốc, hàm lượng quercetin trong chế phẩm còn 90,63% so với ban đầu. Tuổi thọ của chế phẩm về hàm lượng quercetin ở điều kiện thực nghiệm được ước tính khoảng 6,6 tháng tương ứng với tuổi thọ ở điều kiện thường là 13,2 tháng. Bên cạnh đó, sau 06 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc, chế phẩm không thay đổi về mặt cảm quan (bột xốp, màu vàng nhẹ).

**3.1.2. Xác định mật độ vi khuẩn trong chế phẩm ở điều kiện lão hóa cấp tốc của quercetin**

Kết quả xác định mật độ vi khuẩn trong chế phẩm sinh học theo thời gian bảo quản được thể hiện ở bảng 2:

**Bảng 2.** Mật độ vi khuẩn *Bacillus subtilis* theo thời gian thử nghiệm lão hóa cấp tốc quercetin.

Điều kiện bảo quản	Điều kiện lão hóa cấp tốc của quercetin (tháng)			
	Thời điểm (tháng)	0	3	6
<i>B. subtilis</i> (CFU/g)		$6,8 \times 10^7$	$2,84 \times 10^7$	$9,37 \times 10^6$

Kết quả bảng 2 cho thấy, tại điều kiện lão hóa cấp tốc của quercetin, mật độ vi khuẩn không có sự thay đổi đáng kể. Điều này là phù hợp với nhận định của Shibazaki và cộng sự (1998) rằng bào tử của *B. subtilis* không bị bất hoạt khi xử lý ở nhiệt độ thấp hơn 80 °C ở áp suất khí quyển. Do vậy, có thể thấy điều kiện lão hóa cấp tốc của quercetin là chưa phù hợp cho xác định độ ổn định của chế phẩm ở chỉ tiêu mật độ vi sinh vật. Bên cạnh đó, theo tạp chí FDA, khi bảo quản ở 40 °C sau 6 tháng, vi khuẩn *B. subtilis* chỉ bị giảm hoạt động khoảng 15% so với vi khuẩn ở thời điểm ban đầu mà không bị suy giảm nhiều về mật độ tế bào [10].

**3.1.3. Xác định hoạt tính sinh học của chế phẩm ở điều kiện lão hóa cấp tốc**

**3.1.3.1. Hoạt tính chống oxi hóa (DPPH)**

**Bảng 3.** Hoạt tính chống oxi hóa của chế phẩm.

Điều kiện bảo quản	Điều kiện lão hóa cấp tốc của quercetin (tháng)			
	Thời điểm (tháng)	0	3	6
Hoạt tính chống oxi hóa (% DPPH)		$65,89 \pm 0,05$	$64,73 \pm 0,05$	$64,04 \pm 0,05$

Kết quả bảng 3 cho thấy chế phẩm vẫn giữ được hoạt tính chống oxi hóa khi bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc. Kết quả này là phù hợp với sự ổn định của hàm lượng quercetin trong chế phẩm trong thời gian bảo quản. Hàm lượng quercetin có sự liên hệ mật thiết với hoạt tính sinh học của chế phẩm.

**3.1.3.2. Hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm ở điều kiện lão hóa cấp tốc**

**Bảng 4.** Hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm.

Mẫu	Nồng độ (mg/ml)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)					
		<i>E. coli</i>			<i>S. typhi</i>		
		0 tháng	3 tháng	6 tháng	0 tháng	3 tháng	6 tháng
Chế phẩm	1	$9,2 \pm 1,6$	$870 \pm 1,4$	$7,3 \pm 1,7$	$10,3 \pm 1,2$	$9,7 \pm 1,6$	$8,8 \pm 1,5$
	5	$10,5 \pm 1,5$	$9,6 \pm 1,2$	$9,2 \pm 1,5$	$11,2 \pm 1,4$	$10,5 \pm 1,2$	$9,6 \pm 1,3$
	10	$12,6 \pm 1,3$	$10,9 \pm 1,5$	$9,7 \pm 1,5$	$13,5 \pm 1,4$	$12,8 \pm 1,5$	$10,9 \pm 1,2$
DMSO	-	0	0	0	0	0	0
Ciproflaxacin	0,005	$15,6 \pm 1,5$	$15,1 \pm 1,3$	$14,9 \pm 1,5$	$21,2 \pm 1,2$	$20,5 \pm 1,4$	$21,4 \pm 1,1$

Kết quả bảng 4 cho thấy chế phẩm vẫn giữ được hoạt tính kháng khuẩn khi bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc. Mẫu đối chứng âm DMSO không xuất hiện vòng kháng khuẩn đối với các vi khuẩn thử nghiệm. Kháng sinh Ciprofloxacin 5 µg/ml có hoạt tính ức chế mạnh vi khuẩn *E. coli*, *S. typhi* thể hiện ở đường kính vòng kháng khuẩn trung bình lần lượt là 15,2 mm và 21,03 mm. Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn của đối chứng âm (DMSO) và đối chứng dương (Ciprofloxacin) tương đồng với nghiên cứu của Mohapatra và cộng sự (2011) [3]. Chế phẩm có khả năng ức chế sự phát triển của cả 2 chủng vi khuẩn thử nghiệm ở nồng độ chế phẩm 1, 5 và 10 mg/ml theo thời gian thực nghiệm ở điều kiện lão hóa cấp tốc của quercetin. Khả năng kháng khuẩn của chế phẩm tỷ lệ thuận với nồng độ pha loãng, có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua các mốc thời gian bảo quản. Sự ổn định hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm có liên quan đến sự ổn định về hàm lượng quercetin trong chế phẩm [5].

Kết quả cho thấy chế phẩm có sự ổn định về hàm lượng quercetin trong điều kiện bảo quản lão hóa cấp tốc, hoạt tính sinh học của chế phẩm cũng được duy trì so với hoạt tính ở thời điểm ban đầu.

### 3.2. Xác định độ ổn định của chế phẩm bằng phương pháp theo dõi dài hạn

#### 3.2.1. Xác định độ ổn định của chế phẩm về hàm lượng quercetin và mật độ vi khuẩn bằng phương pháp theo dõi dài hạn

Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

**Bảng 5.** Hàm lượng quercetin, mật độ bào tử theo thời gian bảo quản ở điều kiện thường.

STT	Thời gian (tháng)	Hàm lượng quercetin trung bình trong chế phẩm (mg/g)	Mật độ <i>B. subtilis</i> (CFU/g)
1	0	50,52 ± 0,05	6,8 x 10 <sup>7</sup>
2	3	48,28 ± 0,12	3,22 x 10 <sup>7</sup>
3	6	46,64 ± 0,17	9,56 x 10 <sup>6</sup>
4	9	45,98 ± 0,14	7,72 x 10 <sup>6</sup>
5	12	44,74 ± 0,15	5,32 x 10 <sup>6</sup>

Kết quả bảng 5 cho thấy, tại điều kiện nhiệt độ thường 30 °C, hàm lượng quercetin được giữ ổn định theo thời gian bảo quản (12 tháng). Sự suy giảm hàm lượng chỉ khoảng 10% so với hàm lượng ban đầu. Mật độ *B. subtilis* có sự suy giảm theo thời gian bảo quản. Tại 3 tháng bảo quản đầu tiên, mật độ bào tử vẫn giữ được sự ổn định 3,22 x 10<sup>7</sup> CFU/g. Số lượng bào tử giảm dần từ tháng thứ 6. Nguyên nhân của sự suy giảm mật độ bào tử trong chế phẩm có thể do ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ, độ ẩm bên ngoài môi trường.

Tóm lại, độ ổn định của chế phẩm theo chỉ tiêu hàm lượng quercetin tại điều kiện bảo quản dài hạn có sự tương ứng với kết quả dự đoán thời gian bảo quản của chế phẩm bằng phương pháp lão hóa cấp tốc. Chế phẩm có sự ổn định về hàm lượng hoạt chất và mật độ vi sinh vật trong thời gian bảo quản ở nhiệt độ 30 °C, 12 tháng.

#### 3.2.2. Kết quả xác định hoạt tính sinh học của chế phẩm

##### 3.2.2.1. Hoạt tính chống oxi hóa (DPPH)

**Bảng 6.** Hoạt tính chống oxi hóa của chế phẩm.

Điều kiện bảo quản	Điều kiện thường				
	0	3	6	9	12
Thời điểm (tháng)					
Hoạt tính chống oxi hóa (% DPPH)	65,89 ± 0,13	64,59 ± 0,25	63,45 ± 0,15	62,17 ± 0,22	60,04 ± 0,15

Kết quả bảng 6 cho thấy hoạt tính chống oxi hóa của chế phẩm giảm nhẹ theo thời gian bảo quản ở điều kiện thường. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH sau thời gian bảo quản 12 tháng đạt 60,04%, giảm 8,9% so với thời điểm ban đầu. Kết quả này là phù hợp với sự suy giảm nhẹ hàm lượng quercetin trong chế phẩm trong thời gian bảo quản.

3.2.2.2. Hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm ở điều kiện bảo quản dài hạn

**Bảng 7.** Hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm.

Mẫu	Nồng độ (mg/ml)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)									
		<i>E. coli</i>					<i>S. typhi</i>				
		0 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	0 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng
Chế phẩm	1	9,4 ± 1,5	9,2 ± 1,4	9,0 ± 1,5	8,3 ± 1,3	7,3 ± 1,2	10,3 ± 1,2	10,1 ± 1,2	9,8 ± 1,2	9,0 ± 1,5	8,6 ± 1,5
	5	10,2 ± 1,2	10,0 ± 1,3	9,6 ± 1,2	9,2 ± 0,5	8,8 ± 1,2	11,2 ± 1,33	10,9 ± 1,2	10,6 ± 1,2	10,0 ± 1,5	9,0 ± 1,5
	10	12,7 ± 1,3	12,2 ± 1,5	11,2 ± 1,5	10,8 ± 1,4	10,0 ± 1,5	13,7 ± 1,4	13,5 ± 1,5	12,8 ± 1,4	11,9 ± 1,5	10,6 ± 1,2
DMSO	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ciproflaxacin	0,005	15,6 ± 1,5	15,1 ± 1,3	15,6 ± 1,2	15,8 ± 1,3	15,5 ± 1,2	21,2 ± 1,2	20,5 ± 1,4	21,4 ± 1,5	20,5 ± 1,6	20,3 ± 1,5

Kết quả bảng 7 cho thấy chế phẩm vẫn giữ được hoạt tính kháng khuẩn khi bảo quản ở điều kiện thường. Chế phẩm có khả năng ức chế sự phát triển của cả 2 chủng vi khuẩn thử nghiệm ở nồng độ chế phẩm 1, 5 và 10 mg/ml theo thời gian bảo quản (12 tháng). Sự giảm nhẹ hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm có liên quan đến hàm lượng quercetin trong chế phẩm. Như vậy, chế phẩm chứa quercetin và vi khuẩn *B. subtilis* có khả năng kháng khuẩn đối với hai chủng vi khuẩn kiểm định *E. coli* và *Salmonella typhi*. Sự ổn định về hàm lượng quercetin ở điều kiện lão hóa cấp tốc cũng như điều kiện thường giúp chế phẩm duy trì được hoạt tính sinh học ở các điều kiện tương ứng.

#### 4. KẾT LUẬN

Đã xác định được độ ổn định của chế phẩm chứa quercetin và *Bacillus subtilis* bằng phương pháp lão hóa cấp tốc và theo dõi dài hạn. Chế phẩm có độ ổn định ở điều kiện bảo quản nhiệt độ 30°C, độ ẩm tương đối 60 ± 5%. Thời gian bảo quản dự kiến của chế phẩm ở điều kiện trên là 13,2 tháng. Sau thời gian bảo quản ở nhiệt độ thường 30 °C, hàm lượng quercetin trong chế phẩm được duy trì ở 44,74 ± 0,15 mg/g, mật độ *Bacillus subtilis* khoảng 5,32 x 10<sup>6</sup> CFU/g. Chế phẩm trong thời gian bảo quản thể hiện hoạt tính chống oxy hóa với khả năng trung hòa DPPH > 60% và có hoạt tính kháng các vi khuẩn kiểm định *E. coli*, *Salmonella typhi* trong điều kiện thực nghiệm. Cần tiếp tục nghiên cứu để gia tăng thời gian bảo quản của chế phẩm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Aguirre JS., Pin C., Rodriguez MR., García de Fernando GD. "Analysis of the Variability in the Number of Viable Bacteria after Mild Heat Treatment of Food", Appl. Environ. Microbiol, 75, 6992-6997, (2009).
- [2]. Đề tài cấp Viện Công nghệ mới năm 2021 "Nghiên cứu tạo chế phẩm Synbiotic-Plus (chứa chất xơ, men vi sinh, flavonoid) và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa trên động vật thực nghiệm".
- [3]. Mohapatra D. P., V. Thakur., S. K. Brar, "Antibacterial efficacy of raw and processed honey", Biotechnol Res Int, p. 917505, (2011).
- [4]. Mputu Kanyinda., Jean-noel & Jacqueline., Destain & Philippe., Noki & Philippe., Thonart, "Accelerated storage testing of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* BTP1, BB2 and PI9 strains", African journal of biotechnology, 11, 16187-16191, (2012).
- [5]. Jaisinghani., R. N. "Antibacterial properties of quercetin", Microbiology Research, 8, 1, (2017). <https://doi.org/10.4081/mr.2017.6877>.
- [6]. Nguyễn Lâm Dũng., Nguyễn Đình Quyển., Phạm Văn Ty, "Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật", NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 27-35, (1989).

- [7]. Nguyễn Thị Kim Liên, Chế Quang Minh, Nguyễn Hương Thu, “Định lượng flavonoid toàn phần trong cao khô Rau đắng đất (*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC.) bằng phương pháp quang phổ UV-VIS”, Tạp chí Khoa học & Công nghệ số 5, p 57-61, (2018).
- [8]. Plank D. W., Szpylka J., Sapirstein H., Woollard D., Lee V., Chen, C. Y. O.; Liu R. H., Tsao R., Dusterloh A., Baugh S, “Determination of Antioxidant Activity in Foods and Beverages by Reaction with 2,2'-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)”, J. AOAC Intern. 95, 1562-1569, (2012).
- [9]. [https://dav.gov.vn/images/upload\\_file/2022/iii15-huong-dan-nghien-cuu-do\\_on\\_dinh\\_cua\\_thuoc\\_2-phu-luc-i-kem-tt\\_1646996218.pdf](https://dav.gov.vn/images/upload_file/2022/iii15-huong-dan-nghien-cuu-do_on_dinh_cua_thuoc_2-phu-luc-i-kem-tt_1646996218.pdf).
- [10]. <http://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory>.

### ABSTRACT

#### Research on the stability of concentration and biological activity of preparation including *Bacillus subtilis*, quercetin under experimental conditions

*The efficiency of a biological preparation depends on many factors, especially the density of its bacteria. During shelf life, protective conditions do not have any factor that reduces the number of spore bacteria. This study determined the stability of quercetin content (mg), density of *Bacillus subtilis* (CFU/g) and DPPH antioxidant activity (%), antibacterial activity, etc., in storage time. The obtained results showed that after storage time at room temperature of 30 °C, the quercetin content in the preparation was maintained at  $44,74 \pm 0,15$  mg/g, the density of *Bacillus subtilis* was about  $5,32 \times 10^6$  CFU/g. The product, during storage, showed antioxidant activity with the ability to neutralize DPPH > 60% and was active against tested bacteria *E. coli*, *Salmonella* at experimental conditions.*

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; DPPH; Quercetin.