

## Thiết lập quy trình kỹ thuật chế tạo chế phẩm vi sinh *Bacillus subtilis* có bổ sung quercetin và inulin

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

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

\*Email: nguyendlamanh1235@gmail.com.

Nhận bài: 22/6/2022; Hoàn thiện: 20/8/2022; Chấp nhận đăng: 24/8/2022; Xuất bản: 28/10/2022.

DOI: <https://doi.org/10.54939/1859-1043.j.mst.82.2022.105-111>

### TÓM TẮT

Hiện nay, việc bổ sung các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật đặc biệt là quercetin và chất xơ vào chế phẩm probiotic ngày càng nhận được nhiều sự quan tâm. Các nhà khoa học đang tìm cách phát triển các phương pháp nhằm nâng cao tỉ lệ sống của chủng probiotic và giữ được các hoạt tính sinh học của các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật trong khâu làm khô và bảo quản. Trong đó, phương pháp đông khô giúp duy trì tỉ lệ sống của chủng probiotic cao và ổn định. Mục đích của nghiên cứu này là tạo được chế phẩm men vi sinh trị liệu kép từ chủng *Bacillus subtilis* vừa thể hiện vai trò như một probiotic, vừa có hoạt tính sinh học từ quercetin và chất xơ. Kết quả đã thiết lập được công thức chế phẩm, gồm  $105 \pm 5\text{mg/g}$  chất xơ,  $50 \pm 5\text{mg/g}$  quercetin, chất mang maltose/bào tử *Bacillus subtilis* = 5 : 1(w:w); mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt  $6,8 \times 10^7$  cfu/g.

**Từ khoá:** *Bacillus subtilis*; Probiotic; Quercetin; Chất xơ.

### 1. MỞ ĐẦU

Trong lĩnh vực thực phẩm bảo vệ sức khỏe, sản phẩm synbiotic được tạo thành với hai thành phần chủ yếu là chất xơ (prebiotic) và men vi sinh (probiotic). Trong đó, **probiotic** là lợi khuẩn có hiệu quả duy trì sự cân bằng của hệ vi sinh vật đường ruột. **Prebiotic** là chất xơ, giúp kích thích sự phát triển để gia tăng số lượng lợi khuẩn. Hiện nay, phần lớn các sản phẩm thực phẩm bổ sung được sản xuất ở dạng probiotic (lợi khuẩn) hay prebiotic (chất xơ) riêng rẽ. Việc kết hợp hai chất này trong cùng một sản phẩm sẽ nâng cao hiệu quả sử dụng của sản phẩm và tiện lợi cho người tiêu dùng là xu hướng gần đây. Sự kết hợp của probiotic và prebiotic làm tăng khả năng sống sót của các lợi khuẩn đồng thời cải thiện sức khỏe vật chủ thông qua tác dụng hiệp đồng của các thành phần chất xơ và lợi khuẩn trong sản phẩm. Do đó, sự kết hợp của probiotic và prebiotic thành synbiotic là công thức lý tưởng và đang được xem là đột phá mới về dinh dưỡng. [4, 5, 12]. Tại Việt Nam, *Bacillus subtilis* là nhóm vi khuẩn được sử dụng phổ biến làm probiotic vì *B. subtilis* có khả năng cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh qua cơ chế ngăn cản miễn dịch, cạnh tranh vị trí bám dính và sản sinh ra chất kháng khuẩn (bacteriocins). Hơn nữa, *B. subtilis* còn được ưa chuộng do có ưu điểm như: giá thành rẻ, dễ pha trộn, ổn định trong quá trình sản xuất (ép viên, nhiệt,...), dễ bảo quản, hạn sử dụng dài [2]. Do đó, bào tử *B. subtilis* đã được sử dụng rộng rãi làm probiotic cho con người cũng như một số vật nuôi.

Hiện nay, chất xơ inulin đang được sử dụng trong các loại thực phẩm chức năng, đặc biệt trong nhiều loại sản phẩm sữa để tăng cường tính đặc hiệu của các vi khuẩn có lợi trong đường ruột. Bên cạnh đó, inulin còn có tác dụng hỗ trợ tiêu hóa, chống táo bón hiệu quả.

Trong số các hợp chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ thực vật, nhóm polyphenol đặc biệt là flavonoid tiếp tục được quan tâm ứng dụng trong y dược vì khả năng chống oxy hóa mạnh. Chế phẩm synbiotic-plus là sự kết hợp của synbiotic với hợp chất flavonoid (quercetin) sẽ tăng thêm hiệu quả chống oxy hóa, nâng cao hiệu quả bảo vệ sức khỏe. Hiện nay, theo chúng tôi được biết, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào kết hợp sản phẩm synbiotic với nhóm hoạt chất flavonoid (quercetin) nhằm cải thiện hệ vi sinh vật đường ruột và tình trạng stress oxy hóa. Với mục đích sản xuất chế phẩm men vi sinh trị liệu kép từ chủng *B.subtilis* vừa có khả năng cải thiện hệ vi sinh vật đường ruột và góp phần cải thiện tình trạng stress oxy hóa, kích thích miễn dịch; chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu:

- Thiết lập công thức chế phẩm vi sinh *Bacillus subtilis* có bổ sung chất chống oxy hóa (quercetin) và chất xơ từ thực vật (inulin)
- Xác định thông số kỹ thuật của chế phẩm từ bào tử *B. subtilis* ở nồng độ ban đầu  $\geq 10^8$  cfu/g (sau ly tâm).

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vi sinh vật và hoạt chất sinh học

- Chủng vi sinh vật *Bacillus subtilis* được cung cấp bởi Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, được nuôi trên môi trường dịch thể, có nồng độ  $\geq 10^9$  cfu/ml, đạt yêu cầu sản xuất chế phẩm vi sinh.
- Hoạt chất quercetin: Sigma; độ tinh khiết  $\geq 95\%$ .
- Chất xơ: Inulin; Trung Quốc, độ tinh khiết  $\geq 90\%$ .

### 2.2. Hoá chất

- Chất mang bao gồm : Maltose (Việt Nam), Trehalose (Việt Nam), Lactose (Việt Nam).
- Môi trường xác định số lượng vi sinh vật: pepton, cao nấm men, NaCl, thạch agar, NaOH, quỳ tím,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , KCl,  $Ca(NO_3)_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $FeSO_4$ ,...
- Hóa chất phân tích quercetin: methanol,...
- Hóa chất phân tích khả năng chống oxy hóa bằng DPPH: acid ascorbic, dimethyl sulfoxyl (DMSO), Ethanol, DPPH (2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl),...

### 2.3. Thiết bị

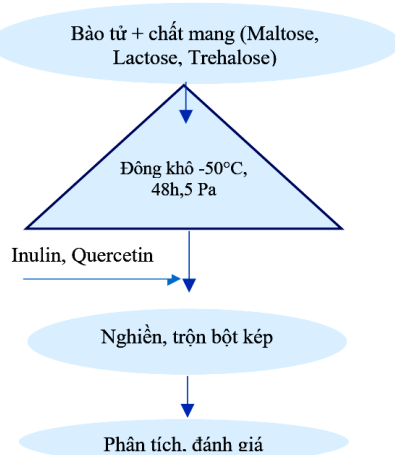
Tủ ấm nuôi cấy vi khuẩn Memmert, máy lắc ổn nhiệt Thermolyme của Mỹ, máy quang phổ Dynamica của Thụy Sĩ, tủ cấy vô trùng Laminar của Pháp, tủ sấy Memmert, nồi khử trùng Autoclave, máy ly tâm lạnh 3 – 18K của Đức,...

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

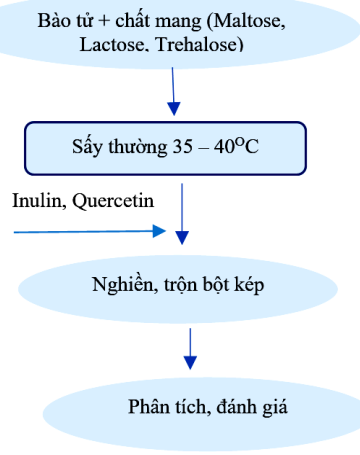
#### 2.4.1. Quy trình kỹ thuật tạo chế phẩm

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* được nuôi trong môi trường DSM, pH 7 ở nhiệt độ 37 °C trong 5 ngày. Sau 5 ngày nuôi cấy, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm thu sinh khối ở tốc độ 6000 vòng/phút, 15 phút. Tủa tế bào vi khuẩn được sử dụng để thu nhận bào tử theo phương pháp được nghiên cứu bởi Duc Le và cộng sự [4]. Dịch bào tử *B. subtilis* thu được đảm bảo nồng độ  $\geq 10^8$  cfu/g được bổ sung chất mang, sử dụng tạo chế phẩm probiotic theo hai phương pháp là đông khô và sấy ở nhiệt độ thấp. Bột probiotic sau đó được bổ sung inulin và quercetin theo phương pháp trộn bột kép. Chế phẩm được phân tích đánh giá dựa trên hàm lượng vi khuẩn *B. subtilis*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm tạo chế phẩm theo 2 quy trình dưới đây:

#### Quy trình 1:



#### Quy trình 2:



#### 2.4.2. Thiết lập công thức

Trong nghiên cứu này hàm lượng quercetin bổ sung vào chế phẩm được lựa chọn ở 4 nồng độ 10 mg/g; 25 mg/g; 50 mg/g; 75 mg/g. Nồng độ quercetin được chọn dựa trên mật độ vi khuẩn và hoạt tính chống oxy hóa trên 1 gam chế phẩm.

Hàm lượng chất xơ bổ sung vào chế phẩm được lựa chọn ở 3 nồng độ 100 mg/g, 125 mg/g, 150 mg/g.

Trên cơ sở đó chúng tôi xác định được công thức:

Chất mang (Lactose, Maltose, Trehalose) + bào tử *B. subtilis* + quercetin + chất xơ.

#### 2.4.3. Xác định mật độ vi khuẩn [9]

Chế phẩm được pha loãng với nước cất khử trùng thành dãy các nồng độ thập phân  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,... Ở nồng độ  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  trải 10-20  $\mu$ L dịch lên đĩa thạch DSM, ủ ở 37 °C, qua đêm.

Đếm số khuẩn lạc ở những đĩa có số lượng khuẩn lạc từ 30 - 300. Lấy giá trị trung bình của các đĩa có cùng nồng độ pha loãng. Số lượng tế bào trong 1 ml hoặc 1 g mẫu được tính theo công thức (1).

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

- Trong đó:
- N: Số lượng tế bào VSV trong 1 ml hoặc 1 g mẫu;
  - A: Số khuẩn lạc trung bình ở cùng nồng độ pha loãng;
  - K: Độ pha loãng của mẫu;
  - V: Lượng mẫu cấy, ml.

#### 2.4.4. Phương pháp xác định hàm lượng quercetin bằng UV - VIS

Hàm lượng quercetin được xác định theo phương pháp UV-VIS: được tiếp cận theo Nguyễn Thị Kim Liên và cộng sự [10].

#### 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): Hòa tan DPPH trong methanol đạt nồng độ 0,25  $\mu$ M. 1 g chế phẩm được hòa trong methanol ở các nồng độ pha loãng khác nhau được cho vào các ống nghiệm thủy tinh. 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 (2).

$$A (\%) = [1 - (A_s - A_0)/A_c] \times 100 \quad (2)$$

- 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.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả xác định phương pháp tạo chế phẩm probiotic *Bacillus subtilis*

##### 3.1.1. Ảnh hưởng của chất mang đến tỉ lệ sống của vi khuẩn

Để tăng khả năng sống sót của những vi khuẩn probiotic người ta thường bổ sung các chất mang vào quá trình đông khô và sấy nhằm bảo vệ cấu trúc mô và tế bào. Các chất mang được sử dụng trong bảo quản vi sinh vật bao gồm: trehalose, lactose, maltose, sucrose, glucose [13].

Trên cơ sở đó, chúng tôi đã lựa chọn: lactose, trehalose, maltose làm chất bảo vệ tế bào theo tỉ lệ chất mang: bào tử là 5:1 (w:w) trong quá trình đông khô và sấy [8]. Kết quả ảnh hưởng của chất mang đến tỉ lệ sống của *B. subtilis* trong chế phẩm probiotic được thể hiện ở bảng 1:

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của chất mang đến tỉ lệ sống *B. subtilis* của chế phẩm vi sinh.

	Đối chứng	Lactose	Trehalose	Maltose
<i>B. subtilis</i> quy trình 1 - đông khô (cfu/g)	$6,5 \times 10^8$	$1,78 \times 10^4$	$1,80 \times 10^5$	$1,20 \times 10^8$
<i>B. subtilis</i> quy trình 2 - sấy (cfu/g)	$6,5 \times 10^8$	$1,70 \times 10^2$	$1,75 \times 10^2$	$2,11 \times 10^3$

Kết quả bảng 1 cho thấy nồng độ *B. subtilis* phụ thuộc nhiều vào việc sử dụng chất mang và ở việc lựa chọn quy trình đông khô hoặc sấy. Ở cả hai quy trình đông khô và sấy; việc sử dụng trehalose và lactose không có hiệu quả trong việc duy trì khả năng sống sót của vi khuẩn. Khi sử dụng chất mang maltose ở quy trình đông khô, mật độ vi khuẩn được bảo toàn so với mẫu đối chứng (không sử dụng chất mang). Ở mẫu đông khô, nồng độ vi khuẩn khi phối trộn với cả 3 chất mang trehalose, maltose, lactose đều cao hơn so với mẫu ở quy trình sấy. Có thể trong quá trình sấy, nhiệt độ sấy làm giảm tỉ lệ sống vi sinh vật, đồng thời ảnh hưởng đến các chất mang với bản chất là đường. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Văn Duy và cộng sự (2015) khi tiến hành đông khô chủng *B. subtilis* sử dụng chất mang là maltose [8]. Do đó, nhóm nghiên cứu lựa chọn chất mang maltose bổ sung vào quá trình đông khô vi khuẩn *B. subtilis* tạo chế phẩm.

### 3.1.2. Xác định tỉ lệ phối trộn chất mang và bào tử vi khuẩn

Để thiết lập quy trình kỹ thuật thu được chế phẩm, ngoài việc đảm bảo lượng chất xơ, quercetin thì việc bổ sung thêm chất mang vào bào tử là cơ sở để duy trì sự ổn định của bào tử vi khuẩn tốt nhất trong chế phẩm. Trong nghiên cứu phía trên, chúng tôi đã lựa chọn được chất mang maltose bổ sung vào quá trình đông khô bào tử vi khuẩn *B. subtilis* tạo chế phẩm. Tiếp theo, cần tính toán tỉ lệ phối trộn chất mang và dịch bào tử thích hợp nhất, tránh dư thừa lượng chất mang gây ảnh hưởng đến quá trình phát triển của vi khuẩn. Kết quả xác định tỷ lệ phối trộn được thể hiện ở bảng 2:

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của tỉ lệ phối trộn chất mang và bào tử đến nồng độ *B. Subtilis*.

	Đối chứng	Tỉ lệ chất mang : bào tử (w/w)		
		5 : 1	7 : 1	9 : 1
<i>B. subtilis</i> quy trình 1 - đông khô (cfu/g)	$6,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$8,5 \times 10^7$	$1,87 \times 10^7$

Kết quả bảng 2 cho thấy nồng độ *B. subtilis* khi phối trộn với maltose ở các tỉ lệ khác nhau có sự khác biệt. Khi phối trộn chất mang : bào tử ở tỉ lệ 5 : 1 (w:w) cho nồng độ *B. subtilis* tương đương so với mẫu đối chứng là mẫu vi khuẩn không trộn chất mang ( $6,5 \times 10^8$  cfu/g). Do đó, chúng tôi lựa chọn tỉ lệ chất mang : bào tử = 5 : 1 (w:w) trong đông khô tạo chế phẩm vi sinh.

### 3.2. Kết quả xác định hàm lượng quercetin

Vì quercetin vừa có hoạt tính chống oxy hóa, vừa có hoạt tính kháng khuẩn, do đó, hàm lượng quercetin là thông số chúng tôi lựa chọn để khảo sát tính chống oxy hóa và tính kháng khuẩn. Kết quả lựa chọn hàm lượng quercetin được thể hiện ở bảng 3.

**Bảng 3.** Kết quả phân tích nồng độ *B. subtilis* và khả năng chống oxy hóa của chế phẩm vi sinh.

	Hàm lượng quercetin				
	0 mg/g	10 mg/g	25 mg/g	50 mg/g	75 mg/g
Nồng độ <i>B. subtilis</i> (cfu/g)	$1,4 \times 10^8$	$8,5 \times 10^7$	$7,4 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$5 \times 10^6$
DPPH (%)	10,26	34,45	45,06	61,17	63,02

Kết quả bảng 3 cho thấy nồng độ *B. subtilis* tỉ lệ nghịch với hàm lượng quercetin trong chế phẩm. Nồng độ *B. subtilis* ban đầu  $1,4 \times 10^8$  cfu/g, khi bổ sung thêm lượng quercetin từ 10 mg/g đến 50 mg/g thì mật độ *B. subtilis* giảm xuống còn  $10^7$  cfu/g. Mật độ *B. subtilis* giảm còn  $10^6$  cfu/g khi bổ sung 75 mg/g quercetin, giảm xuống khoảng 100 lần so với nồng độ ban đầu. Từ kết quả bảng 3 cho thấy, khi hàm lượng quercetin càng nhiều thì mật độ *B. subtilis* càng giảm, có thể là do bổ sung quercetin nhiều dẫn đến ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Theo Artur và cộng sự

(2019), quercetin thể hiện khả năng kháng khuẩn yếu đối với các chủng *B. subtilis*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. Pneumoniae* [1]. Các tác giả chỉ ra rằng quercetin ức chế sự phát triển của *B. subtilis* và *E. coli* thông qua sự phá hủy thành và màng tế bào vi khuẩn. Quercetin thể hiện hoạt tính kháng khuẩn yếu đối với chủng *B. subtilis* ở nồng độ tối thiểu MIC đạt 4 µg/µL. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có thông tin cho thấy sự tác động của hợp chất quercetin đối với chủng *B. subtilis* ở giai đoạn bào tử.

Bên cạnh đó, quercetin được biết đến như một chất có khả năng chống oxy hóa. Phân tích kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu có hàm lượng quercetin 75 mg/g có khả năng bắt gốc oxy hóa DPPH cao hơn hẳn (63,02%) so với mẫu đối chứng (10,26%). Khả năng bắt gốc oxy hóa của các mẫu có hàm lượng quercetin 10 mg/g; 25 mg/g; 50 mg/g cao gấp 3-6 lần so với mẫu đối chứng. Mẫu có hàm lượng quercetin 50 mg/g và 75 mg/g có khả năng bắt gốc oxy hóa ngang nhau, khoảng trên 60%. Nhưng nồng độ *B. subtilis* ở hai mẫu có sự khác biệt, mẫu hàm lượng quercetin 50 mg/g có nồng độ cao khoảng 10 lần so với mẫu có hàm lượng quercetin 75 mg/g. Vì vậy, nhóm nghiên cứu lựa chọn mẫu chế phẩm với hàm lượng quercetin 50 mg/g vừa có khả năng duy trì hoạt hóa chủng giống và thể hiện khả năng chống oxy hóa cao để thực hiện nghiên cứu cho thí nghiệm tiếp theo.

**3.3. Kết quả xác định hàm lượng chất xơ**

Sau khi đã tạo được chế phẩm vi sinh đông khô, nhóm nghiên cứu tiếp tục nghiên cứu xác định hàm lượng chất xơ và quercetin để phối trộn vào chế phẩm theo phương pháp trộn bột kép, trộn đồng lượng. Ở kết quả xác định công thức chế phẩm với chỉ tiêu nghiên cứu là khả năng chống oxy hóa của chế phẩm (mục 3.2); chúng tôi đã lựa chọn được quercetin với hàm lượng 50 mg/g chế phẩm, với nồng độ *B. subtilis* trong chế phẩm  $\geq 10^7$  cfu/g. Trong nghiên cứu này hàm lượng chất xơ trong chế phẩm probiotic và quercetin được chúng tôi lựa chọn tiếp cận theo nghiên cứu của Reyes Becerril và cộng sự, 2014 [6]. Kết quả xác định ảnh hưởng của hàm lượng chất xơ đến nồng độ *B. subtilis* trong chế phẩm được thể hiện ở bảng 4:

**Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng chất xơ đến nồng độ *B.subtilis*.**

	Đối chứng	Hàm lượng inulin		
		100 mg/g	125 mg/g	150 mg/g
Nồng độ <i>B. subtilis</i> (cfu/g) trong chế phẩm probiotic+ quercetin	$6,8 \times 10^7$	$6,42 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7$	$9,64 \times 10^6$

Khi bổ sung thêm lượng chất xơ từ 100 mg/g đến 150 mg/g thì mật độ *B. subtilis* giảm so với mẫu đối chứng. Mật độ *B. subtilis* giảm còn  $10^6$  cfu/g khi bổ sung inulin ở nồng độ 150 mg/g chế phẩm, giảm xuống khoảng 100 lần so với nồng độ ban đầu. Từ kết quả bảng 4 cho thấy, khi hàm lượng chất xơ càng nhiều thì mật độ *B. subtilis* càng giảm. Đồng thời với vai trò như một prebiotic, hàm lượng chất xơ khi bổ sung quá nhiều sẽ dẫn đến hiện tượng rối loạn tiêu hóa với người sử dụng [7]. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Giani và cộng sự (2022) khi phối trộn chất xơ hòa tan với tỉ lệ 100 mg/g chế phẩm probiotic cho hiệu quả tốt lên hệ vi sinh vật của người thử nghiệm [3]. Do đó, chúng tôi bổ sung inulin với hàm lượng 100 mg/g chế phẩm.

Vậy công thức chế phẩm bao gồm:

Chất xơ + quercetin (đảm bảo nồng độ  $50 \pm 5$ mg/g) + Vừa đủ bào tử vi khuẩn và chất mang để tạo thành 100g chế phẩm nồng độ *B. subtilis*  $\geq 10^7$  CFU/g

**3.4. Kết quả bào chế chế phẩm**

Từ các kết quả trên chúng tôi tiến hành tạo chế phẩm synbiotic - plus và kiểm tra lại các thông số của chế phẩm. Dịch bào tử vi khuẩn *B. subtilis* ( $6,5 \times 10^8$  cfu/g) được trộn với chất mang là maltose theo tỉ lệ 1:5 (w:w) và được đông khô. Bột đông khô được phối trộn lẫn lượt với chất xơ và quercetin theo phương pháp trộn đồng lượng. Kết quả được thể hiện trên hình 1 và bảng 5.



**Hình 1.** Chế phẩm vi sinh *B. subtilis* có bổ sung hoạt chất sinh học quercetin và inulin.

**Bảng 5.** Thông số kỹ thuật của chế phẩm.

	Nồng độ <i>B. subtilis</i> (cfu/g)	Hàm lượng quercetin (mg/g)	DPPH (%)	Chất xơ (mg/g)
Chế phẩm vi sinh <i>Bacillus subtilis</i> có bổ sung hoạt chất sinh học quercetin và chất xơ	$6,8 \times 10^7$	52,5	60,08	105,7

#### 4. KẾT LUẬN

Đã xác định được công thức chế phẩm bao gồm:  $105 \pm 5$  mg/g chất xơ -  $50 \pm 5$  mg/g quercetin - chất mang maltose/ bào tử *B. subtilis* = 5 : 1 (w:w). Mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt  $6,8 \times 10^7$  cfu/g. Sản phẩm chế phẩm vi sinh *Bacillus subtilis* có bổ sung hoạt chất sinh học từ thực vật có dạng bột màu vàng mịn, khô rời, xốp và có khả năng chống oxy hóa với khả năng khử DPPH đạt 60,08%. Chế phẩm synbiotic-plus sẽ được sử dụng để nghiên cứu độ ổn định và khả năng chống lại tình trạng stress oxy hóa trên động vật thực nghiệm..

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả cảm ơn sự tài trợ về kinh phí của 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”.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A.V. Ravi., K.S. Musthafa., G. Jegathammbal., K. Kathiresan, S.K. Pandian, “Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture”, Department of Biotechnology, Alagappa University, Karaikudi – 630 003, Tamil Nadu, India, (2007).
- [2]. Barbosa T.M., Cláudia R. Serra., Roberto M. La Ragione., Martin J. Woodward., and Adriano O. Henriques, “Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Applied and environmental microbiology”. 71(2), 968-978, (2005).
- [3]. De Giani A., Sandionigi A, Zampolli J, “Effects of Inulin-Based Prebiotics Alone or in Combination with Probiotics on Human Gut Microbiota and Markers of Immune System: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study in Healthy Subjects. Microorganisms”, 10(6):1256, (2022).
- [4]. Duc le H., Hong HA., Barbosa TM., Henriques AO., Cutting SM, “Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use”. Appl Environ Microbiol, 70(4):2161-2171, (2004).
- [5]. Maloy Kumar Sahu., N. S. Swarnakumar., K. Sivakumar., T. Thangaradjou & L. Kannan, “Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives”. Indian Journal of Microbiology volume 48, 299–308, (2008).
- [6]. Martha Reyes-Becerril., Felipe Ascencio., Vicente Gracia-Lopez., Ma. Esther Macias., Marcos Cadena Roa & María Ángeles Esteban, “Single or combined effects of *Lactobacillus sakei* and inulin on growth, non-specific immunity and IgM expression in leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*)”. Fish Physiology and Biochemistry volume 40, 1169–1180, (2014).
- [7]. Nguyễn Công Khẩn, Phạm Văn Hoan, “Nhu cầu dinh dưỡng khuyến nghị cho người Việt Nam”, NXB Y học, (2007).

- [8]. Nguyễn Văn Duy., Trần Vũ Đình Nguyên, “*Xây dựng quy trình đông khô vi khuẩn Bacillus nhằm bổ sung vào thức ăn nuôi hải sản*”. Tạp chí Công nghệ Sinh học 13(1), 177-187, (2015).
- [9]. Nguyễn Lâm Dũng., Nguyễn Đình Quyền., Phạm Văn Ty, “*Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật*”, NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 27-35, (1989).
- [10]. 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, pp. 57-61, (2018).
- [11]. Plank D. W., Szpylka J., Sapirstein H., Woollard D., Lee V., Chen, C. Y. O.; Liu R. H., Tsao R., Düsterloh 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).
- [12]. Qunlan Zhou., Kangmin Li., Xie Jun., Liu Bo, “*Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture*”. Bioresource Technology 100, 3780–3786, (2009).
- [13]. Zdenek Hubálek, “*Protectants used in the cryopreservation of microorganisms*”. Cryobiology, 46, pp. 205–229, (2003).

### ABSTRACT

#### **Establishment of a technical process for manufacturing *Bacillus subtilis* microbial products with the addition of quercetin and inulin**

*Currently, the addition of biologically active compounds from plants, especially quercetin and fiber, to the preparation of probiotics has been gaining extensively attention. Scientists are developing methods to improve the survival of probiotics and activity of bioactive plant-based matrices in probiotics during dry and storage. Among them, lyophilization helped maintain high survival and stable probiotic. The aim of this study was to produce a dual therapy probiotic product from Bacillus subtilis with both probiotic and plant-based bioactive properties from quercetin and fiber. The results established the composition that contains  $105 \pm 5$  mg/g fiber,  $50 \pm 5$  mg/g quercetin, maltose/ *Bacillus subtilis* spores = 5:1 (w:w), microbial density reached  $6.8 \times 10^7$  cfu/g.*

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; Probiotic; Quercetin; Fiber.