

Xác định điều kiện thu nhận sinh khối *Bacillus subtilis* để tạo chế phẩm Synbiotic-Plus

Nguyễn Hà Trung, Nghiêm Ngọc Hoa, Nguyễn Lâm Anh*,
Lê Huy Hoàng, Phạm Kiên Cường

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

*Email: nguyendlamanh1235@gmail.com

Nhận bài: 29/8/2022; Hoàn thiện: 08/11/2022; Chấp nhận đăng: 28/11/2022; Xuất bản: 20/12/2022.

DOI: <https://doi.org/10.54939/1859-1043.j.mst.FEE.2022.253-259>

TÓM TẮT

Synbiotic là thực phẩm bảo vệ sức khỏe, được tạo thành bởi hai thành phần chính là chất xơ (prebiotic) và men vi sinh (probiotic). Synbiotic có chức năng lợi khuẩn, cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột. Ở Việt Nam, vi khuẩn *Bacillus subtilis* đang được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm probiotics bởi khả năng hình thành bào tử của chúng. Bào tử có thể nảy mầm và sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí ở đường ruột, vì thế duy trì được quần thể vi khuẩn có lợi trong ruột. Mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sự sinh trưởng, phát triển của chúng và xác định một số tính chất của chúng từ đó làm tiền đề cho lên men tạo chế phẩm Synbiotic-Plus. Kết quả đã xác định được điều kiện nuôi cấy chủng vi sinh *Bacillus subtilis*: môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của chủng *B. subtilis* là DSM, pH 7, ở nhiệt độ 37 °C, tốc độ lắc 200 rpm sau 3 ngày nuôi cấy. Hiệu suất hình thành bào tử 85,57%. Chủng *B. subtilis* thể hiện tính chất của chủng probiotic như có khả năng sinh enzyme ngoại bào (cellulase, amylase, protease), khả năng kháng khuẩn (đối với *E. coli*, *Salmonella*).

Từ khóa: *Bacillus subtilis*; Synbiotic; Probiotic; Prebiotic.

1. MỞ ĐẦU

Synbiotic là thực phẩm bảo vệ sức khỏe, chúng được tạo thành bởi hai thành phần chính là chất xơ (prebiotic) và men vi sinh (probiotic). Synbiotic có chức năng lợi khuẩn, cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột. Trên thị trường hiện nay các sản phẩm bổ sung chủ yếu ở dạng lợi khuẩn (probiotic). Do đó, cần tích hợp chất xơ (prebiotic) và men vi sinh (probiotic) để nâng cao hiệu quả sử dụng sản phẩm và phù hợp với nhu cầu của người tiêu dùng.

Ở Việt Nam, vi khuẩn *Bacillus subtilis* đang được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm probiotics. Vi khuẩn *B. subtilis* được cơ quan quản lý thực phẩm và thuốc của Hoa Kỳ (FDA) xếp vào nhóm an toàn GRAS (Generally Regarded As Safe). *Bacillus subtilis* được quan tâm bởi khả năng hình thành bào tử của chúng. Bào tử có thể nảy mầm và sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí ở đường ruột, vì thế duy trì được quần thể vi khuẩn có lợi trong ruột. Chính vì vậy, công nghệ sản xuất probiotic dưới dạng bào tử đã được hình thành và hiện nay đang được nhiều công ty dược phẩm lớn áp dụng thành công như Sanofi-Aventis, Pháp. Probiotic nếu sản xuất dưới dạng bào tử sẽ bền vững ở dải pH rộng, từ môi trường axit của dạ dày tới môi trường kiềm nhẹ của ruột [5]. Probiotic dạng bào tử như *Bacillus subtilis* đang được xem là probiotic thế hệ mới có ưu điểm vượt trội hơn probiotic sử dụng tế bào sống đang phổ biến hiện nay.

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sự sinh trưởng, phát triển của chúng và xác định một số tính chất của chúng như: hoạt tính kháng khuẩn, khả năng sinh enzyme ngoại bào, khả năng hình thành bào tử, từ đó làm tiền đề cho lên men tạo chế phẩm Synbiotic-Plus.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *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 $\geq 10^{10}$ cfu/ml, đạt yêu cầu sản xuất chế phẩm vi sinh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến sự sinh trưởng của chủng probiotic *Bacillus subtilis*

2.2.1.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sự sinh trưởng và phát triển của chủng *B. subtilis*

Chủng vi khuẩn được lựa chọn được nuôi trên các loại môi trường khác nhau là LB, DSM, NB, PCB. Đây là các môi trường không chọn lọc và giàu dinh dưỡng thường được sử dụng trong các nghiên cứu về vi khuẩn. Thành phần chính của các loại môi trường được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các môi trường nuôi cấy

Thành phần	LB	DSM	NB	PCB
Pepton (g)	10	5	10	5
Cao nấm men (g)	5	3	-	2,5
Cao thịt	-	-	5	-
Dextrose	-	-	-	1
NaCl (g)	10	-	5	-
KCl (g)	-	3	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O (g)	-	0,25	-	-
Ca(NO ₃) ₂ 1M (ml)	-	1	-	-
FeSO ₄ 10mM (ml)	-	0,1	-	-
MnCl ₂ 1M (ml)	-	1	-	-
H ₂ O (ml)	1000	1000	1000	1000

Các môi trường được điều chỉnh về pH 7; khử trùng ở 121°C, 20 phút. Chủng *B. subtilis* được nuôi ở 37 °C trong 24 giờ, tỷ lệ giống 5% (v/v), 200 rpm. Sau thời gian nuôi cấy, vi khuẩn được xác định mật độ bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 600 nm.

2.2.1.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống lên sự sinh trưởng và phát triển của chủng *B. subtilis*

Chủng được hoạt hóa bằng cách lấy 1 khuẩn lạc trong đĩa LB nuôi lỏng trong môi trường LB ở 37 °C, 200 rpm, qua đêm. Sau đó, chủng được cấy theo tỷ lệ 1%, 2%, 3%, 4%, 5% (v/v) vào môi trường nuôi cấy DSM và nuôi ở 37 °C, 200 rpm. Mật độ vi khuẩn theo các tỷ lệ nuôi cấy được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 600 nm.

2.2.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh trưởng và phát triển của chủng *B. subtilis*.

Chủng được hoạt hóa bằng cách lấy 1 khuẩn lạc trong đĩa LB nuôi lỏng trong môi trường LB ở 37 °C, 200 rpm, qua đêm. Bổ sung 5% giống vào môi trường nuôi cấy DSM và nuôi lắc ở 200 rpm trong dải nhiệt độ sau: 25, 30, 37, 40, 45 °C. Mật độ vi khuẩn khi nuôi ở các nhiệt độ khác nhau được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 600 nm.

2.2.1.4. Ảnh hưởng của pH lên sự sinh trưởng và phát triển của *B. subtilis*

Chủng được hoạt hóa bằng cách lấy 1 khuẩn lạc trong đĩa LB nuôi lỏng trong môi trường LB ở 37 °C, 200 rpm, qua đêm. Bổ sung 5% giống vào các môi trường nuôi cấy DSM đã điều chỉnh sẵn pH 5, 6, 7, 8, 9 và nuôi lắc ở 200 rpm, 37 °C. Mật độ vi khuẩn khi nuôi ở các pH khác nhau được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 600 nm.

2.2.1.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự sinh trưởng và phát triển của *B. subtilis*

Chủng được hoạt hóa bằng cách lấy 1 khuẩn lạc trong đĩa LB nuôi lỏng trong môi trường LB ở 37 °C, 200 rpm, qua đêm. Bổ sung 5% giống vào các môi trường nuôi cấy DSM, pH 7 ở 200 rpm, 37 °C. Sau mỗi bốn giờ thu dịch nuôi cấy để xác định mật độ tế bào qua giá trị OD 600 nm

2.2.2. Lên men thu nhận sinh khối chủng *B. subtilis* quy mô 2 lít/mẻ

Từ các điều kiện thích hợp ở trên, tiến hành nuôi cấy dịch vi khuẩn *B. subtilis* trong hệ thống

lên men 2 lít/mẻ. Các thông số cơ bản của quá trình lên men được kiểm soát như tốc độ khuấy 200 vòng/phút, tốc độ sục khí 2 lít/phút, pH, nhiệt độ nuôi cấy, tỷ lệ giống,... thích hợp từ các nghiên cứu phía trên. Sau 3 ngày lên men tiến hành ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút, 10 phút, ở nhiệt độ thường, thu sinh khối vi khuẩn *B. subtilis*.

2.2.3. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Huynh (2016) có điều chỉnh như sau [6]: Vi khuẩn gây bệnh được nuôi trong môi trường LB, 37 °C trong 24 giờ. Vi khuẩn *B. subtilis* được hoạt hóa trong môi trường LB và ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Tiến hành cấy 50 µL huyền phù vi khuẩn gây bệnh lên các đĩa thạch và dùng que cấy trải đều. Sau đó, đục lỗ và bơm 10 µL dịch vi khuẩn *B. subtilis* vào đĩa thạch đã được trải vi khuẩn gây bệnh, và đem ủ ở 37 °C trong 24 giờ.

2.2.4. Phương pháp xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào

Thử nghiệm khả năng sinh một số loại enzyme như: *protease*, *amylase*, *xenlullase*. Cấy *Bacillus subtilis* trên đĩa chứa các môi trường LB có chất cảm ứng thích hợp. Ủ ở 37°C trong 48 giờ. Đọc kết quả bằng các thuốc thử Lugol (amylase), thuốc thử Congored 1% (cellulase), (NH₄)₂SO₄ bão hòa (protease) [8].

2.2.5. Xác định khả năng hình thành bào tử của chủng *Bacillus subtilis*

Chủng *Bacillus subtilis* được nuôi lỏng trên môi trường DSM ở 37 °C. Sau 3 ngày nuôi cấy, dịch nuôi vi khuẩn được xử lý nhiệt ở 80 °C, 10 phút; sau đó được cấy gạt trên môi trường LB đặc ở 37 °C. Sau 24 h, đếm số lượng bào tử được hình thành. Dịch nuôi cấy không xử lý nhiệt cũng được thực hiện tương tự nhằm xác định hiệu suất sinh bào tử của chủng vi khuẩn.

2.2.6. Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn

Sinh khối 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 µL 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 [3].

$$N = A \times 1/K \times 1/V$$

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

2.3. 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 1,5/2 ml của Sigma,...

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng *B. subtilis*

3.1.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sự sinh trưởng và phát triển của chủng *B. subtilis*

Kết quả ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sự sinh trưởng của chủng *B. subtilis* sau 24 h được thể hiện ở bảng 2:

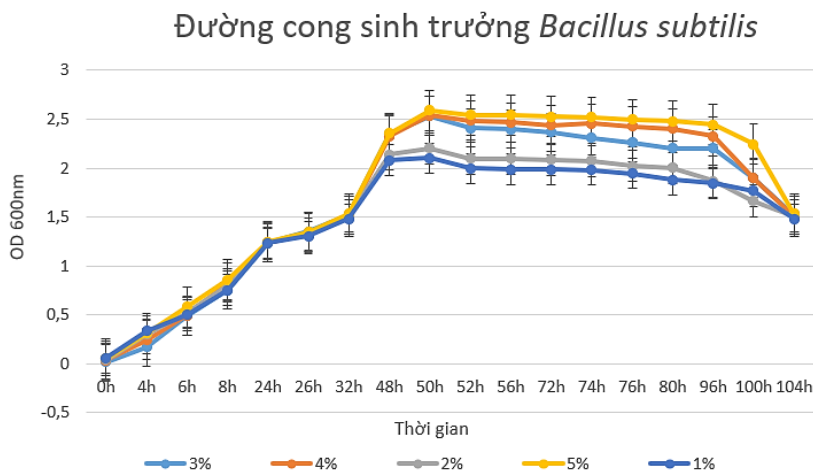
Bảng 2. Ảnh hưởng của các môi trường nuôi cấy.

Môi trường	LB	DSM	NB	PCB
OD 600nm	1,262 ± 0,05	1,257 ± 0,05	0,897 ± 0,05	0,873 ± 0,05

Kết quả thể hiện trên bảng 2 cho thấy, LB và DSM cho sự phát triển của *B. subtilis* là cao nhất. Kết quả này là phù hợp với nhiều nghiên cứu của các tác giả trước đó. Tuy nhiên, với mục tiêu thu được các bào tử vi khuẩn để sử dụng làm nguyên liệu tạo chế phẩm, chúng tôi lựa chọn môi trường DSM cho nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* ở các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống lên sự sinh trưởng và phát triển của chủng *B. subtilis*

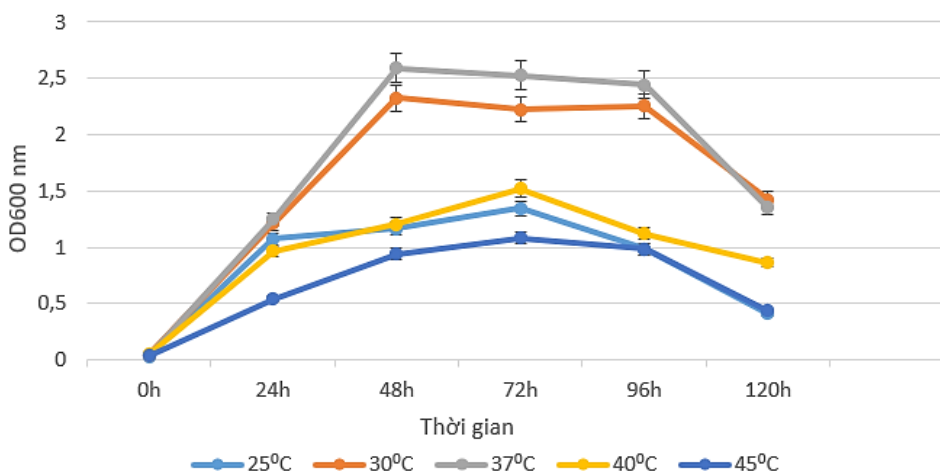
Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ giống lên sự sinh trưởng và phát triển của chủng *B. subtilis* được thể hiện trên hình 1:



Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống lên sự phát triển của *B. subtilis*.

Hình 1 cho thấy sự phát triển của vi khuẩn tỷ lệ thuận với phần trăm giống ban đầu được cho vào môi trường nuôi cấy. Tỷ lệ tiếp giống 5% cho mật độ tế bào chủng *B. subtilis* cao nhất, tỷ lệ tiếp giống 1% cho mật độ tế bào thấp nhất. Ở tỷ lệ tiếp giống 2%, 3%, 4% không cho sự sai khác nhiều ở mật độ vi khuẩn. Ở các tỷ lệ tiếp giống, vi khuẩn phát triển nhanh theo pha log từ 4 h đến 48 h và đạt cực đại ở 50 h nuôi cấy (sau 2 ngày nuôi cấy). Tiếp đó là pha cân bằng, số vi khuẩn sinh ra tương đương với số vi khuẩn chết đi. Sau 96 h nuôi cấy, mật độ vi khuẩn giảm nhanh do lúc này các chất dinh dưỡng trong môi trường cạn kiệt, vi khuẩn sinh ra các sản phẩm trao đổi chất ảnh hưởng đến sự phát triển của chính nó. Do đó, chúng tôi lựa chọn 5% giống là tỷ lệ tiếp giống bổ sung vào môi trường nuôi cấy cho các thí nghiệm tiếp theo.

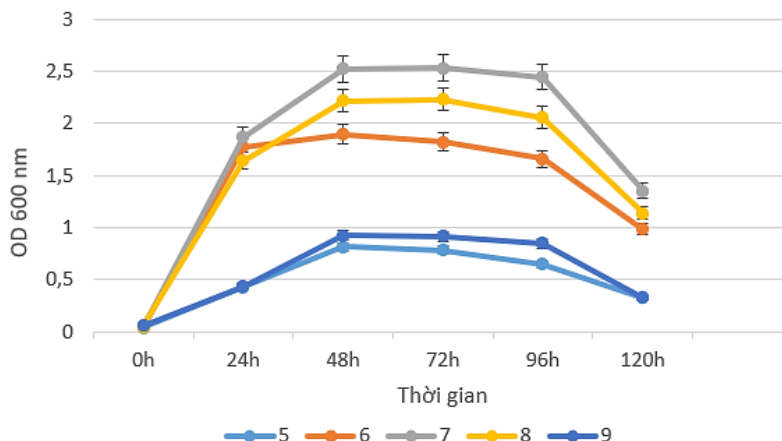
3.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh trưởng và phát triển của chủng *B. subtilis*



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của *B. subtilis*.

Mật độ tế bào chủng *B. subtilis* đạt giá trị cao nhất ở 37 °C, cao hơn lần lượt 2 lần và 2,7 lần so với mật độ tế bào ở 40 °C và 45 °C (hình 2). Chủng *B. subtilis* sinh trưởng tốt ở khoảng nhiệt độ từ 35 - 40 °C phù hợp với thân nhiệt của đa số vật nuôi cũng là một lợi thế khi chọn làm chế phẩm probiotic.

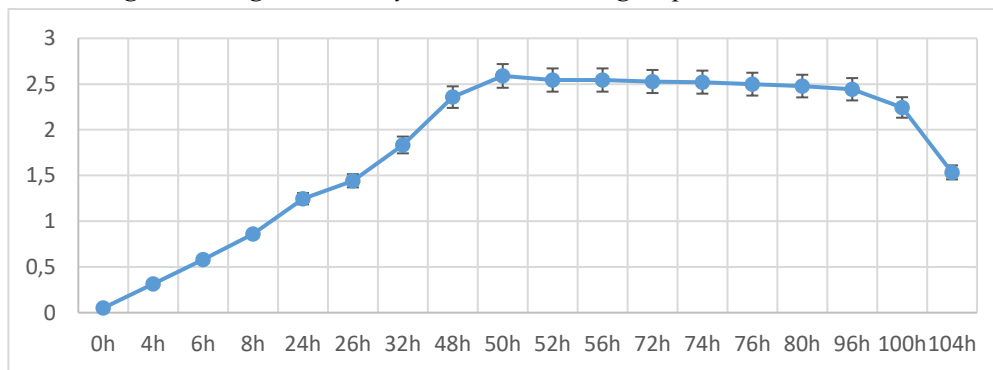
3.1.4. Ảnh hưởng của pH lên sự sinh trưởng và phát triển của *B. subtilis*



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của *B. subtilis*.

Chủng *B. subtilis* sinh trưởng tốt ở giá trị pH trung tính tới kiềm nhẹ và tốt nhất ở pH 7 (hình 3). Kết quả này cũng phù hợp với khoảng giá trị pH thích hợp cho sự sinh trưởng của các chủng *B. subtilis* trong các nghiên cứu trước như: chủng *B. subtilis* Natto thích hợp sinh trưởng ở pH 7,5 [1], chủng *B. subtilis* SK09 thích hợp với pH 6,72 [4].

3.1.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự sinh trưởng và phát triển của *B. subtilis*



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự sinh trưởng của *B. subtilis*.

Biểu đồ hình 4 thể hiện đường cong sinh trưởng của chủng *Bacillus subtilis*. Chủng này phát triển mạnh sau bốn giờ nuôi cấy, đạt cực đại tại sau 50 h nuôi cấy (3 ngày). Khoảng thời gian từ 50 h đến 96 h nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng của chủng đạt cân bằng và sau 96 h nuôi, vi khuẩn tiến vào pha suy vong. Lúc này, chất dinh dưỡng của môi trường cạn kiệt, vi khuẩn sinh ra các chất độc từ quá trình trao đổi chất, do vậy tốc độ phát triển giảm hẳn.

3.2. Lên men thu nhận sinh khối chủng *B. Subtilis* quy mô 2 lít/mẻ

Chủng *Bacillus subtilis* được nuôi lỏng trên môi trường DSM ở 37 °C. Sau 3 ngày nuôi cấy, dịch nuôi vi khuẩn được xử lý nhiệt ở 80 °C, 10 phút; sau đó được cấy gọt trên môi trường DSM đặc ở 37 °C. Sau 24 h, đếm số lượng bào tử được hình thành. Dịch nuôi cấy không xử lý nhiệt cũng được thực hiện tương tự nhằm xác định hiệu suất sinh bào tử của chủng vi khuẩn. Kết quả xác định khả năng sinh bào tử của vi khuẩn được thể hiện trên bảng 3.

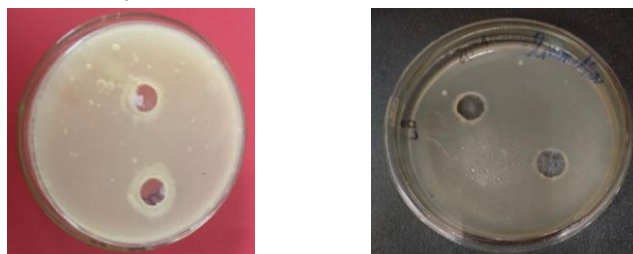
Bảng 3. Khả năng sinh bào tử của chủng *B. subtilis*.

Mẫu	CFU/mL	Hiệu suất hình thành bào tử (%)
Không xử lý nhiệt	$6,1 \times 10^8$	85,57
Xử lý nhiệt	$5,22 \times 10^8$	

Bảng cho thấy chủng *Bacillus subtilis* có khả năng hình thành bào tử trong môi trường sinh bào tử DSM với hiệu suất lần lượt là 85,57%.

3.3. Xác định hoạt tính kháng khuẩn

Hiệu quả của một sản phẩm probiotic là khi đưa vào đường tiêu hóa sẽ giúp gia tăng sự chuyển hóa thức ăn, tăng khả năng miễn dịch, ngoài ra còn có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh, giúp cân bằng hệ vi sinh đường ruột, và hạn chế các bệnh đường tiêu hóa. Chủng vi khuẩn *B. subtilis* được khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh *E. coli*, *Salmonella* sp bằng phương pháp đối kháng trực tiếp. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *B. subtilis* được trình bày ở hình 5.



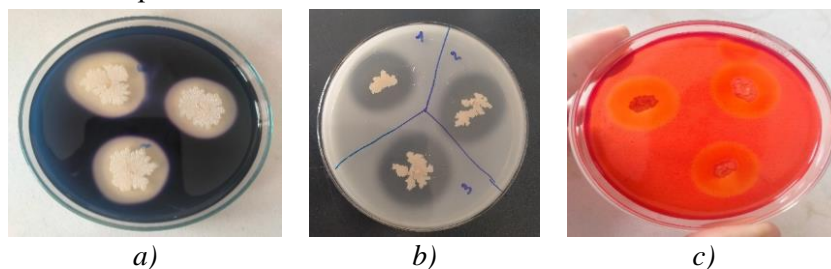
a) Hoạt tính kháng *E. coli*. (b) Hoạt tính kháng *Salmonella*.

Hình 5. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng *Bacillus subtilis*.

Kết quả trên hình 5 cho thấy *B. subtilis* có khả năng kháng khuẩn đối với hai chủng vi khuẩn gây bệnh là *E. coli* và *Salmonella*. Tuy nhiên, chủng này thể hiện khả năng kháng *E. coli* tốt hơn so với kháng *Salmonella*. Kết quả khảo sát tính kháng khuẩn của Jianhua (2009) cho thấy, *B. subtilis* LFB112 có khả năng đối kháng đồng thời với cả 2 nhóm vi khuẩn Gram dương và Gram âm (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp) [7].

3.4. Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào của *B. subtilis*

Các enzyme ngoại bào đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ tiêu hóa thức ăn, giúp thức ăn dễ hấp thu. Do đó, khả năng sinh enzyme ngoại bào là một tiêu chí quan trọng khi chọn lọc các chủng vi khuẩn làm probiotic.



Hình 6. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của *B. subtilis*:

a) Hoạt tính amylase; b) Hoạt tính cellulase; c) Hoạt tính protease.

Kết quả từ hình 6 cho thấy, chủng *B. subtilis* đều có khả năng sinh amylase, protease và cellulase. Theo một nghiên cứu của Ngô Tự Thành và Bùi Thị Việt Hà (2009) trên 236 chủng *Bacillus* phân lập từ mẫu đất và nước thải, chỉ có 2 chủng T20 và M27 thể hiện đầy đủ các hoạt tính như phân hủy cả amylase, gelatine và chất béo trong sữa, các chủng còn lại chỉ thể hiện tính năng phân hủy protein và tinh bột [2].

4. KẾT LUẬN

- Đã xác định được điều kiện nuôi cấy chủng vi sinh *Bacillus subtilis*: môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của chủng *B. subtilis* là DSM, pH 7, ở nhiệt độ 37 °C, tốc độ lắc 200 rpm sau 3 ngày nuôi cấy. Hiệu suất hình thành bào tử 85,57%. Các điều kiện nuôi cấy được sử dụng cho lên men thu sinh khối vi khuẩn, tạo chế phẩm.

- Chủng *B. subtilis* thể hiện tính chất của chủng probiotic như có khả năng sinh enzyme ngoại bào (cellulase, amylase, protease), khả năng kháng khuẩn (đối với *E. coli*, *Salmonella*).

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]. Đoàn Thị Ngọc Thanh, Phạm Nguyễn Kim Lài, Phạm Thị Thúy Ngoan. “Đặc tính Probiotic và khả năng làm tan huyết khối của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* Natto”. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56 (1): 104 – 110, (2020).
- [2]. Ngô Tự Thành, Bùi Thị Việt Hà, Vũ Minh Đức, Chu Văn Mẫn. “Nghiên cứu hoạt tính enzym ngoại bào của một số chủng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải”. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 25: 101 – 106, (2009).
- [3]. 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).
- [4]. G. Sreekumar1, Soundarajan Krishnan. “Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology”. African Journal of Biotechnology. 9 (45): 8078-8084, (2010).
- [5]. Hoa T. T., Duc, L. H., Istatico R., Baccigalupi L., Ricca E., Van P. H. and Cutting S. M. “The fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model”, Appl. Environ. Microbiol. 67: 3819-3823, (2001).
- [6]. Huynh, T. H. N. and Nguyen, T. H. “Examining Some Probiotics Activities of *Bacillus subtilis* natto”, International Journal of Modern Engineering Research. 6 (5): 33 –37, (2016).
- [7]. Jianhua Xie, Rijun Zhang, Changjiang Shang and Yaoqi Guo, “Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens”. African Journal of Biotechnology. 8 (20): 5611-5619, (2009).
- [8]. Shimizu M. “Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis*(natto) N-77”. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56 (8): 1266-1269, (1992).

ABSTRACT

Determining the conditions for obtaining *Bacillus subtilis* biomass to create Synbiotic-Plus

Synbiotics are food supplements that protect health, they are made up of two main ingredients, fiber (prebiotic) and probiotics (probiotic). Synbiotics have the function of beneficial bacteria, balancing the microbiome in the gut. In Vietnam, Bacillus subtilis is widely used in probiotic production. Bacillus subtilis is of interest because of its spore-forming ability. Spores can germinate and grow under anaerobic conditions in the intestinal tract, thus maintaining a population of beneficial bacteria in the gut. The purpose of this study is to evaluate the influence of medium factors on the growth and development of the strain and determine some properties of the strain, thereby making a premise for fermentation to produce Synbiotic-Plus. The results determined the conditions for culturing Bacillus subtilis strains: the optimal media for the growth and development of B. subtilis strain was DSM, pH 7, 37 °C, speed 200 rpm, 5 days of incubation. Spore formation efficiency was 85,57%. The strain B. subtilis exhibits the properties of the probiotic strain such as the ability to produce extracellular enzymes (cellulase, amylase, protease), antibacterial ability (E. coli, Salmonella).

Keywords: *Bacillus subtilis*; Synbiotic; Probiotic; Prebiotic.