

RESEARCH ON PROCESS FOR PREPARATION OF ENTVN HARD CAPSULES CONTAINING PROBIOTIC *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

Bui Thi Lan Anh^{1*}, Hoang Giang², Dao Nguyen Manh¹

¹Vietnam – Russia Tropical Center, ²Hanoi University of Science - VNU

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 25/10/2023	The study presents the process of preparing EntVN hard capsules from <i>Enterococcus faecium</i> F26BA and F54BA probiotic strains isolated from Vietnamese food sources. The concentration of pasteurized milk to create starter biomass is 15% (w/w), the time to freeze dry the wet biomass is 24 hours, the ratio of filler excipient (soybean powder) to probiotic biomass is 1:4 (biomass: excipients, w/w), probiotic biomass powder is obtained with colony density of 4.5×10^{10} CFU/g after 4 hours at 40°C drying temperature. Biomass powder (460 mg/capsule) after fine grinding mixed with filler excipients (20 mg/capsule), adhesive excipients (10 mg/capsule), smoothing excipients (10 mg/capsule), then encapsulation is proceeded. The obtained EntVN capsules met the criteria of weight (error no more than 7.5%), disintegration (less than 30 minutes), infection limit, heavy metal content and number of colonies (3.3×10^{10} CFU/g). EntVN capsules are prepared from indigenous probiotic strains with characteristics that are easily adapted and suitable for Vietnamese people, as well as common ingredients, simple process and moderate price for local market.
Revised: 25/3/2024	
Published: 29/3/2024	
KEYWORDS	
<i>Enterococcus faecium</i> F26BA	
<i>Enterococcus faecium</i> F54BA	
Hard capsule	
Probiotic	
EntVN 500 mg	

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH BẢO CHẾ VIÊN NANG CỨNG ENTVN CHỨA PROBIOTIC *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

Bùi Thị Lan Anh^{1*}, Hoàng Giang², Đào Nguyên Mạnh¹

¹Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga, ²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐH Quốc gia Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 25/10/2023	Nghiên cứu tiến hành xây dựng quy trình bào chế viên nang cứng EntVN từ các chủng lợi khuẩn <i>Enterococcus faecium</i> F26BA và F54BA được phân lập từ nguồn thực phẩm Việt Nam. Nồng độ sữa tiệt trùng để tạo sinh khối giống khởi động là 15% (w/w), thời gian tiến hành đông khô sinh khối ướt là 24 giờ, tỷ lệ tá dược độn (bột đậu nành) được trộn với sinh khối probiotic 1:4 (sinh khối:tá dược, w/w), nhiệt độ sấy 40°C trong 4 giờ thu được bột sinh khối probiotic có mật độ khuẩn lạc đạt $4,5 \times 10^{10}$ CFU/g. Bột sinh khối (460 mg/viên nang) sau khi nghiền mịn trộn với tá dược độn (20 mg/viên nang), tá dược dính (10 mg/viên nang), tá dược trơn chảy (10 mg/viên nang), tiến hành đóng nang. Viên nang EntVN thu được đạt các chỉ tiêu về khối lượng (sai số không quá 7,5%), độ rã (dưới 30 phút), các chỉ tiêu về giới hạn nhiễm khuẩn, hàm lượng kim loại nặng và lượng khuẩn lạc ($3,3 \times 10^{10}$ CFU/g). Viên nang EntVN được bào chế từ các chủng lợi khuẩn bản địa với các đặc điểm dễ dàng thích nghi và phù hợp với người Việt, nguyên liệu bào chế phổ biến, quy trình đơn giản, giá thành vừa phải đáp ứng được nhu cầu thị trường Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 25/3/2024	
Ngày đăng: 29/3/2024	
TỪ KHÓA	
<i>Enterococcus faecium</i> F26BA	
<i>Enterococcus faecium</i> F54BA	
Viên nang cứng	
Probiotic	
EntVN 500 mg	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9051>

* Corresponding author. Email: lananhrus@gmail.com

1. Giới thiệu

Probiotic được Tổ chức Y tế Thế giới và Tổ chức Lương thực Thế giới (WHO/FAO) định nghĩa là những vi sinh vật sống khi đưa vào cơ thể với liều thích hợp sẽ mang lại những hiệu quả tích cực đối với sức khỏe của vật chủ [1], [2]. Trong vòng hai thập kỷ gần đây, sự quan tâm và nhu cầu của người tiêu dùng với probiotic ngày càng cao, từ đó góp phần thúc đẩy các nghiên cứu liên quan đến lĩnh vực này [3]. Hiện nay, probiotic chứa các chủng lợi khuẩn *Enterococcus faecium* được coi là chế phẩm thể hệ mới bởi những tác dụng hiệu quả hỗ trợ điều trị các bệnh đường tiêu hóa, viêm dạ dày mãn tính, loét dạ dày, hội chứng ruột kích thích, viêm tụy và viêm gan mãn tính [4], [5]. Tuy nhiên, đây là các chủng giống nhập khẩu, khó thích nghi, sống trong điều kiện sống, tập quán ăn uống của người Việt Nam. Với mong muốn phát triển chế phẩm probiotic và phù hợp với người dân Việt Nam, nhóm nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu quy trình sản xuất probiotic từ các chủng lợi khuẩn *Enterococcus faecium* F26BA và F54BA được phát hiện và phân lập tại Việt Nam. Đây là các chủng lợi khuẩn đã được nhóm nghiên cứu phân lập từ nguồn thực phẩm bản địa Việt Nam, với các đặc tính quan trọng như tính kháng khuẩn, giảm cholesterol, có tính bám dính và khả năng sống trong môi trường dịch mật, pH thấp. Đánh giá tính an toàn nhận thấy các chủng không chứa các gen mã hóa gây độc, an toàn trong các thử nghiệm đánh giá độc tính cấp, độc tính bán trường diễn trên động vật thực nghiệm.

Do đặc tính của từng loài lợi khuẩn khác nhau, với mỗi nhóm lợi khuẩn sẽ có các quy trình sản xuất riêng phù hợp với loài đó [6]-[8]. Các sản phẩm probiotic đạt chất lượng, quy trình sản xuất phải tuân thủ các yêu cầu khắt khe: lựa chọn chủng giống, môi trường nuôi cấy, tối ưu quy trình lên men, tạo sinh khối, pha trộn tá dược, đóng viên. Không những vậy, chế phẩm sau sản xuất phải đạt được sự cân bằng về tỷ lệ probiotic, prebiotic, hương liệu, mật độ tế bào [9]. Quan trọng nhất chế phẩm sau khi sản xuất, mật độ lợi khuẩn ổn định $>10^8$ CFU/g, không chứa các kim loại nặng, không nhiễm khuẩn [1], [10], [11]. Chính vì vậy, tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất viên nang cứng probiotic là vô cùng cần thiết.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng giống: 02 chủng *Enterococcus faecium* F26BA và F54BA được phân lập từ mẫu thực phẩm bản địa tại Việt Nam. Dữ liệu trình tự toàn bộ genome được đăng ký tại ngân hàng gen (GenBank under the accession number) với mã thứ tự là JARGGM000000000 và JARDYX000000000. Sữa bột Devondale nguyên kem, Úc. Bột đậu nành được bào chế từ đậu nành (*Glycine max*) trồng tại Việt Nam rang chín và nghiền mịn. Tá dược đạt theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V [12].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo sinh khối giống khởi động

Chủng giống *Enterococcus faecium* F26BA và F54BA được hoạt hóa trên môi trường thạch MRS, nhân giống khởi động lần lượt trong từng chai thủy tinh, mỗi chai chứa 01 lít dung dịch sữa bột tiệt trùng tại các nồng độ 5%, 10%, 15%. Ủ tại nhiệt độ 37°C trong 72 giờ trong tủ ấm CellXpert (Eppendorf). Ly tâm trên máy ly tâm lạnh Allegra X-15R (Beckman Coulter) với tốc độ 4000 vòng/phút trong 30 phút loại bỏ dung dịch nổi. Kiểm tra khối lượng sinh khối tại từng nồng độ khác nhau.

2.2.2. Đông khô sinh khối

Sản phẩm sinh khối ướm thu được sau quá trình lên men, tiến hành đông khô loại bỏ nước lạnh tại -80°C trong vòng 24 giờ, 48 giờ trên máy sấy đông khô Biobase. Sản phẩm sau đông khô dạng khối bột xốp, tơi, được sử dụng vào bước trộn tá dược.

2.2.3. Quy trình trộn tá dược độn và sấy khô

Sử dụng bột đậu nành phối trộn với khối bột chứa chủng *Enterococcus faecium* F26BA và F54BA sau quá trình đông khô sinh khối. Tối ưu hóa các công thức trộn tại các nồng độ khác nhau CT1, CT2, CT3 và CT4.

CT1: Bột đậu nành: sinh khối probiotic theo tỷ lệ 1:1

CT2: Bột đậu nành: sinh khối probiotic theo tỷ lệ 2:1

CT3: Bột đậu nành: sinh khối probiotic theo tỷ lệ 3:1

CT4: Bột đậu nành: sinh khối probiotic theo tỷ lệ 4:1

Sấy hỗn hợp nguyên liệu theo dải nhiệt độ 35°C, 40°C, 45°C và 50°C trong 4 giờ, 6 giờ và 8 giờ. Đánh giá chất lượng thành phẩm bột.

2.2.4. Khảo sát công thức đóng nang

Phương pháp đóng nang: Bột nguyên liệu probiotic sau khi sấy khô được nghiền nhỏ và rây qua rây 180 để đạt kích thước tiểu phân phù hợp. Bột được trộn với tá dược độn (bột đậu nành) và tá dược dính (dung dịch PVP K30 được trộn với ethanol 90% với tỷ lệ 1:4, lọc qua rây 250), sau đó xát hạt qua rây 500, sấy hạt ở nhiệt độ 50°C cho đến khi đạt độ ẩm khoảng 5%. Sàng hạt qua rây 250. Trộn đều bột với tá dược trơn (talc). Đóng nang số 0 bằng thiết bị vô nang bán tự động.

Bảng 1. Thành phần công thức bào chế viên nang

Thành phần (1 viên 500 mg)	CT5	CT6	CT7	CT8	CT9
Bột probiotic	460	460	460	460	460
Bột đậu nành	30	25	20	15	10
PVP K30/ethanol 90% (tỷ lệ 1:4)	5	10	10	10	5
Talc	5	5	10	15	25

Khảo sát bột đóng nang: Tiến hành khảo sát bột đóng nang từ 05 công thức (Bảng 1) qua các chỉ tiêu:

+ Độ đồng đều khối lượng: Lấy 20 viên nang, thử độ đồng đều khối lượng theo phương pháp 2, phụ lục 11.3 Dược điển Việt Nam V [12]. Yêu cầu: Chênh lệch khối lượng viên không quá 7,5% so với khối lượng trung bình.

+ Độ rã: Lấy 6 viên nang, thử độ rã của viên nang bằng máy đo độ rã PTZ-S theo phương pháp tại Phụ lục 11.6 Dược điển Việt Nam V [12]. Yêu cầu: Độ rã của các viên nang không quá 30 phút.

2.2.5. Kiểm soát chất lượng trong quá trình sản xuất

Tại mỗi giai đoạn sản xuất, tiến hành định lượng mật độ khuẩn lạc *Enterococcus faecium* tại các điều kiện tối ưu khác nhau theo TCVN 8177 (ISO 7889) [10] trên môi trường thạch MRS. Kiểm tra tình trạng nhiễm khuẩn của sản phẩm bằng môi trường Liofilchem® Chromatic Detection. Môi trường chọn lọc này có khả năng phát hiện đồng thời các nhóm vi khuẩn gây bệnh đường ruột bằng hiện thị màu trên môi trường thạch nuôi cấy. *Enterococcus faecium* có màu xanh ngọc lam, các chủng *E. coli* có màu hồng tím, *Klebsiella pneumoniae* màu xanh lá cây. Trục khuẩn *Proteus mirabilis* có màu nâu, *Pseudomonas aeruginosa* màu vàng nhạt, *Staphylococcus aureus* có màu trắng kem.

2.2.6. Đánh độ ổn định sản phẩm bột và viên nang probiotic

Kiểm tra các chỉ tiêu chất lượng của bột nguyên liệu và viên nang probiotic theo TCVN 9633:2013 [11]. Với viên nang, sử dụng bằng phương pháp lão hóa cấp tốc để đánh giá độ ổn định. Tiến hành đánh giá trên 03 lô thử được bảo quản tại 40°C ± 2°C, độ ẩm tương đối của không khí 75% ± 5%.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả tạo sinh khối giống khởi động

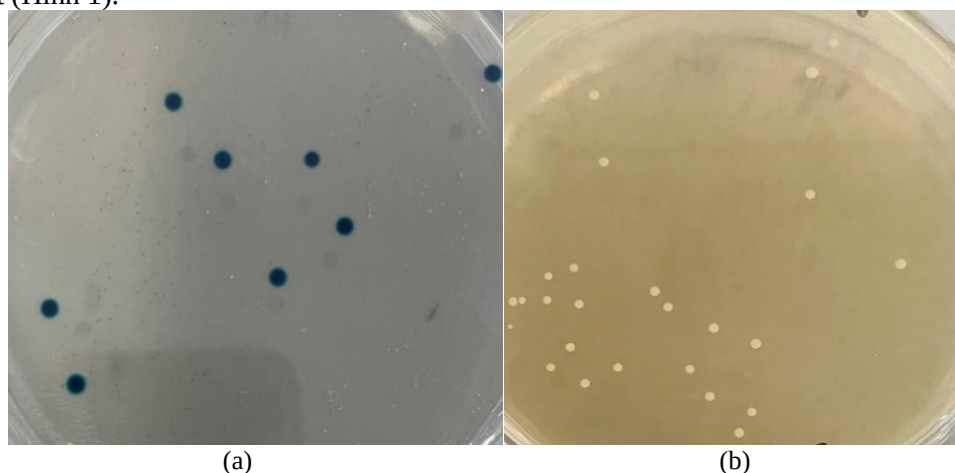
Tại các nồng độ sữa khác nhau 5%, 10% và 15 % nhận thấy lượng sinh khối trong dung dịch sữa 15% có hiệu suất tăng sinh cao nhất. Khả năng sinh trưởng của chủng *E. faecium* F26BA và F54BA lần lượt đạt hiệu suất 77,3% và 98,6%. Sinh khối màu trắng đục, có mùi thơm nhẹ, thanh, hơi chua (bảng 2). Lựa chọn nồng độ sữa 15% cho quá trình khởi động và tạo sinh khối chế phẩm cho các giai đoạn tiếp theo.

Bảng 2. Khối lượng sinh khối sau lên men

STT	Chủng giống	Thể tích	Khối lượng sinh khối sau ly tâm tăng tại các nồng độ sữa (g)			
			5% (50 g/L)	10% (100 g/L)	15% (150 g/L)	20% (200 g/L)
1	<i>E. faecium</i> F26BA	1L	82 (tăng 64% so với khối lượng sữa ban đầu)	168 (68%)	266 (77,3%)	332 (66%)
2	<i>E. faecium</i> F54BA	1L	85 (70%)	182 (82%)	298 (98,6%)	360 (80%)

$$\text{Hiệu suất} = \frac{\text{Khối lượng sau tăng sinh} - \text{Khối lượng sữa ban đầu}}{\text{Khối lượng ban đầu}} \quad (1)$$

Mật độ khuẩn lạc của sinh khối sữa 15% sau 72 giờ lên men đạt $1,2 \times 10^{11}$ CFU/ml, kiểm tra khả năng nhiễm khuẩn trên môi trường thạch Chromatic Detection, nhận thấy chỉ có chủng *E. faecium* có màu xanh lam, dịch sinh khối không nhiễm khuẩn, chủng giống sinh trưởng và phát triển tốt (Hình 1).



Hình 1. Khuẩn lạc *E. faecium* trên môi trường Chromatic Detection (a) và MRS (b)

3.2. Xác định thời gian đông khô sinh khối

Quá trình đông khô và tách nước làm tăng mật độ khuẩn lạc nhiều lần so với lượng sinh khối sữa ban đầu. Không những vậy, quá trình đông khô còn giúp bảo toàn sự sống của vi khuẩn. Việc xác định được thời gian đông khô ngắn nhất mà vẫn đảm bảo đủ lượng lợi khuẩn và độ ẩm sinh khối góp phần tiết kiệm nhiên liệu cũng như rút ngắn được thời gian sản xuất chế phẩm. Sinh khối ướt được đông khô và theo dõi sau 4, 8, 12, 24 và 48 giờ. Sau 24 giờ sinh khối đã được đông khô hoàn toàn, sự khác biệt về kết quả đông khô sau 24 giờ và 48 giờ không có sự khác biệt đáng kể, vì vậy nhóm nghiên cứu lựa chọn thời gian đông khô phù hợp là 24 giờ.

3.3. Kết quả tối ưu hóa điều kiện tạo bột khối probiotic

Yêu cầu đối với các công thức phối trộn đó là lượng bột đậu nành trộn đều với sản phẩm sinh khối chủng giống sau đông khô. Toàn bộ lớp đậu nành bao phủ các chủng giống. Bột đậu nành có tác dụng giúp cung cấp thức ăn cho chủng giống, giúp các chủng lợi khuẩn có thể phát triển. Chính vì vậy, chúng tôi chọn công thức CT4 (bột đậu nành: sinh khối probiotic theo tỷ lệ 4:1), toàn bộ lượng bột bao phủ hoàn toàn các chủng giống. Không những vậy, CT4 và CT1 không có

sự khác biệt về mật độ khuẩn lạc (bảng 3). Lựa chọn công thức CT4 sử dụng trong quy trình tạo bột khối sẽ giảm chi phí sản xuất và chất lượng sản phẩm không thay đổi.

Bảng 3. Mật độ khuẩn lạc của bột khối probiotic

Công thức	Tỷ lệ trộn	Mật độ khuẩn lạc $\times 10^{10}$ (CFU/g) trong 4 giờ				Mật độ khuẩn lạc (CFU/g) trong 6 giờ				Mật độ khuẩn lạc (CFU/g) trong 8 giờ			
		30°	35°	40°	45°	30°	35°	40°	45°	30°	35°	40°	45°
CT1	1:1	5	5,2	5,2	0,5	5	5,2	5,2	0,5	5,0	5,2	5,2	0,5
CT2	1:2	4,5	4,5	4,2	0,25	4,1	4,25	4,2	0,2	4,5	4,5	4,2	0,25
CT3	1:3	3,6	3,6	3,6	0,16	3,6	3,6	3,6	0,06	3,6	3,6	3,6	0,16
CT4	1:4	4,5	4,5	4,5	0,15	4,45	4	3,3	0,1	4,5	4,2	3,35	0,15

Kiểm soát độ ẩm của chế phẩm là một trong những yêu cầu quan trọng trong sản xuất viên nang. Để đảm bảo mật độ khuẩn lạc và độ ẩm tối thiểu của viên nang cứng sau khi đóng thành phẩm là <5%, nhóm nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ sấy bột tại 40°C trong vòng 4 giờ với CT4. Độ ẩm của bột khối sấy CT4 tại 40°C là 4,5%, đáp ứng yêu cầu về độ ẩm trong chế phẩm viên nang. Như vậy, công thức CT4 được lựa chọn với khoảng thời gian sấy 4 giờ tại 40°C không những đảm bảo mật độ khuẩn lạc ($4,5 \times 10^{10}$ CFU/g), độ ẩm theo yêu cầu mà thời gian sản xuất rút ngắn, tiết kiệm chi phí sản xuất, giúp hạ giá thành sản phẩm. Bột có màu vàng nhạt, thơm mùi sữa. Kiểm tra chất lượng bột cao, không phát hiện nhóm vi sinh vật gây độc như nấm men, nấm mốc, *Staphylococci* dương tính *coagulase*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

3.4. Kết quả khảo sát công thức đóng nang

Kết quả đánh giá khảo sát công thức đóng nang được trình bày tại bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát công thức đóng nang

Chỉ tiêu đánh giá	CT5	CT6	CT7	CT8	CT9
Khối lượng trung bình viên nang (mg)	487±15,6	491±9,5	501±8,7	505±11,8	507±10,9
Độ rã trung bình viên nang (phút)	16±3,5	19±2,7	17±3,1	14±2,8	13±3,6

Theo kết quả khảo sát công thức đóng nang, CT7 có khối lượng đạt được độ ổn định cao nhất và có khối lượng đạt với mục tiêu bào chế viên nang 500 mg, độ rã của viên nang ở cả 5 công thức đều đạt yêu cầu (dưới 30 phút). Viên nang cứng được bào chế theo CT7 có vỏ màu tím, bột trong màu vàng nhạt, mùi thơm, độ ẩm đo được là 4,55%, độ rã trung bình 17±3,1 phút. Kiểm tra chất lượng viên nang, không phát hiện nhóm vi sinh vật gây độc như nấm men, nấm mốc, *Staphylococci* dương tính *coagulase*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, hàm lượng kim loại nặng Pb, Cd, Hg. Mật độ khuẩn lạc ngay sau đóng viên là $3,3 \times 10^{10}$ CFU/g (đạt so với tiêu chuẩn probiotic của WHO $\geq 10^8$ CFU/g) [11]. Nhóm nghiên cứu lựa chọn CT7 để tiến hành bào chế và đánh giá độ ổn định của viên nang (Hình 2).



Hình 2. Bột probiotic chuẩn bị đóng nang (a) và viên nang sau khi thành phẩm (b)

3.5. Đánh giá độ ổn định viên nang probiotic

Độ ổn định của viên nang được xác định bằng phương pháp lão hóa cấp tốc (bảo quản ở nhiệt độ $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối của không khí $75\% \pm 5\%$). Kết quả phân tích các chỉ tiêu kỹ thuật theo sau 1 và 3 tháng bảo quản tại điều kiện lão hóa, mật độ khuẩn lạc giảm từ $3,3 \times 10^{10}$ CFU/g xuống lần lượt là 3×10^{10} CFU/g và 5×10^9 CFU/g. Mật độ khuẩn lạc đáp ứng được yêu cầu cơ bản về các sản phẩm probiotic. Phân tích các chỉ tiêu theo Dược điển Việt Nam và TCVN 9633:2013, không phát hiện các dấu hiệu nhiễm khuẩn, nhiễm kim loại nặng, các chỉ số về độ rã, độ ẩm, độ đồng đều khối lượng và tro toàn phần đạt yêu cầu. Kiểm tra độ hòa tan của viên nang tại các nồng độ pH 1,2; 4,5 và 7,4 trong môi trường dịch muối mật 0,3%, kết quả trị giá Q% của viên nang là 70%, đáp ứng được yêu cầu đối với phép thử độ hòa tan của viên nang cứng (bảng 5) [11], [12].

Bảng 5. Các chỉ tiêu kỹ thuật sau 1,3 tháng bảo quản bằng phương pháp lão hóa cấp tốc [12]

Chỉ tiêu kỹ thuật	Mức, yêu cầu	Sau 1 tháng	Sau 3 tháng
Mật độ khuẩn lạc <i>E. Faecium</i> (CFU/g)	$\geq 10^8$	3×10^{10}	5×10^9
Độ rã	Dưới 30 phút	28 phút	28,5 phút
Độ ẩm, %	≤ 5	4,55	4,53
Độ đồng đều khối lượng (mg/viên)		500 mg $\pm$ 6,6%	500 mg $\pm$ 6,5%
Tro toàn phần %		3,53	3,52
Độ tan Q%	$\geq 70\%$	-	70%
Giới hạn nhiễm khuẩn			
Tổng số nấm men, nấm mốc (CFU/g)	< 10	< 10	< 10
<i>Enterobacteriaceae</i> (CFU/g)	< 10	< 10	< 10
<i>Staphylococci</i> dương tính coagulase (CFU/g)	< 10	KPH	KPH
<i>Salmonella</i> spp.	KPH	KPH	KPH
<i>Listeria monocytogenes</i>	KPH	KPH	KPH
Kim loại nặng (Pb, Cd, Hg)	< 1,00 mg/kg	KPH	KPH

*KPH: Không phát hiện

Như vậy, đến thời điểm hiện tại, có thể xác định được hạn sử dụng của viên là 6 tháng trong điều kiện bình thường. Nhóm nghiên cứu tiếp tục đánh giá độ ổn định viên nang probiotic tại thời điểm sáu tháng trong điều kiện lão hóa cấp tốc để xác định chính xác hạn sử dụng của viên nang probiotic.

4. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã xây dựng và tối ưu thành công quy trình sản xuất probiotic từ chủng lợi khuẩn *Enterococcus faecium* F26BA và F54BA. Các chỉ tiêu kỹ thuật đạt theo tiêu chuẩn trong nước đối với các sản phẩm sữa lên men. Quy trình công nghệ không quá phức tạp, nguyên vật liệu bột đậu nành được trồng rộng rãi tại Việt Nam, chủng lợi khuẩn bản địa với các đặc điểm dễ dàng thích nghi và phù hợp với người Việt, đáp ứng được nhu cầu thị trường Việt Nam.

Viên nang probiotic 500 mg được bào chế thành công với thành phần: Bột nguyên liệu probiotic 460, bột đậu nành 20, PVP K30 10, talc 10. Mật độ khuẩn lạc *E. faecium* của viên nang sau 3 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc đạt 5×10^9 CFU/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] FAO/WHO, "Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Report of a Joint FAO-WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria," *Córdoba*, 2001. [Online]. Available: http://www.mesanders.com/docs/probio_report.pdf2001. [Accessed May 2023].
- [2] C. Hill, F. Guarner, G. Reid, G. R. GHCRK Ton, D. J. Merenstein, B. Pot *et al.*, "Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic," *Nat Rev Gastroenterol Hepato*, vol. 11, no. 8, pp. 506-514, 2014.

-
- [3] I. Jankovic, W. Sybesma, P. Phothirath, E. Ananta, and A. Mercenier, "Application of probiotics in food products—challenges and new approaches," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 21, no. 2, pp. 175-181, 2010.
- [4] Y. Nami, N. Abdullah, B. Haghshenas, D. Radiah, R. Rosli, and A. Y. Khosroushahi, "Probiotic assessment of *Enterococcus durans* 6HL and *Lactococcus lactis* 2HL isolated from vaginal microflora," *J. Med. Microbiol*, vol. 63, pp. 1044-1051, 2014a, doi: 10.1099/jmm.0.074161-0.
- [5] C. M. A. P. Franz, M. Huch, H. Abriouel, W. Holzapfel, and A. Gálvez, "Enterococci as probiotics and their implications in food safety," *Int. J. Food Microbiol*, vol. 151, no. 2, pp. 125-140, 2011.
- [6] V. G. Radchenko, "Disturbance of the gut microbio-cenosis and its correction in patients with chronic liver diseases and their correction in patients with the syn-drome of chronic intrahepatic cholestasis," *Gastroenterology of Saint-Petersburg*, vol. 2-3, M120, 2004.
- [7] A. Serio, C. Chaves-López, A. Paparella, and G. Suzzi, "Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese," *Int. Dairy J.*, vol. 20, pp. 459-464, 2010, doi: 10.1016/j.idairyj.2010.02.005.
- [8] K. Fenster, "Important Steps in the Probiotic Manufacturing Process," *J Prob Health*, vol. 10, no. 3, 2022, doi:10.35248/2329-8901.22.10.260.
- [9] K. Beyer, M. Domingo-Sàbat, and A. Ariza, "Molecular pathology of Lewy body diseases," *Int J Mol Sci*, vol. 10, no. 3, pp. 724-745, 2009.
- [10] TCVN 8177 (ISO 7889), Yogurt – Enumeration of characteristic microorganisms – Colony-count technique at 37°C.
- [11] TCVN 9633:2013 (ISO 27205:2010), Fermented milk products – Bacterial starter cultures – Standard of identity.
- [12] Ministry of Health, *Vietnamese Pharmacopoeia V*. Medical Publishing House, Hanoi, 2018 (in Vietnamese).