

STORAGE STABILITY OF FREEZE-DRIED BACILLUS CLAUSII POWDERS

Khong Thi Ngoc Anh¹, Ngo Nguyen Quynh Anh^{1,2}, Dam Thanh Xuan^{1*}

¹Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Cua Nam Ward, Ha Noi City, Vietnam

²Hai Duong Central College of Pharmacy - 324 Nguyen Luong Bang, Le Thanh Nghi Ward, Hai Phong City, Vietnam

Received: 13/09/2025

Revised: 02/10/2025; Accepted: 08/10/2025

ABSTRACT

Objective: This study was conducted to evaluate the storage stability of freeze-dried *Bacillus clausii* powders according to the ICH Q5C guideline.

Methods: 3 formulations were developed: formulations A (mannitol), formulations B (maltodextrin + trehalose), and formulations C (a combination of 3 excipients). Freeze-dried powders were packaged in two container systems (amber glass vials and multilayer aluminum pouches) and stored under long-term conditions (25°C/60% RH) for 12 months. Key quality attributes were monitored, and data were analyzed using linear regression and ANOVA with a significance threshold of $p < 0.05$.

Results: All formulations maintained viable counts above 10 log CFU/g after 12 months, though the rates of decline varied considerably. Formulations A showed the fastest reduction, whereas formulations B exhibited the highest stability. The aluminum pouch demonstrated superior control of water activity (AW) and residual moisture compared with glass vials, thereby supporting better biological stability.

Conclusion: The storage stability of freeze-dried *Bacillus clausii* powders was influenced by both protective excipients and packaging. Formulations B in aluminum pouches provided optimal performance, suggesting a practical approach for developing more stable and sustainable probiotic formulations for industrial applications.

Keywords: *Bacillus clausii*, freeze-drying, storage stability, packaging.

*Corresponding author

Email: xuandt@gmail.com Phone: (+84) 904607584 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3475>

ĐỘ ỔN ĐỊNH TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN CỦA BỘT ĐÔNG KHÔ BACILLUS CLAUSII

Khổng Thị Ngọc Anh¹, Ngô Nguyễn Quỳnh Anh^{1,2}, Đàm Thanh Xuân^{1*}

¹Trường Đại học Dược Hà Nội - 13-15 Lê Thánh Tông, P. Cửa Nam, Tp. Hà Nội, Việt Nam

²Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương - 324 Nguyễn Lương Bằng, P. Lê Thanh Nghị, Tp. Hải Phòng, Việt Nam

Ngày nhận: 13/09/2025

Ngày sửa: 02/10/2025; Ngày đăng: 08/10/2025

ABSTRACT

Mục tiêu: Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá độ ổn định bảo quản của bột đông khô chứa *Bacillus clausii* theo hướng dẫn ICH Q5C.

Phương pháp: 3 công thức bào chế được thiết kế: công thức A (mannitol), công thức B (maltodextrin + trehalose) và công thức C (hỗn hợp 3 tá dược). Mẫu bột đông khô được đóng gói trong hai loại bao bì (lọ thủy tinh hồ phách và túi nhôm phức hợp), sau đó bảo quản ở điều kiện dài hạn (25°C/60% RH) trong 12 tháng. Các chỉ tiêu được theo dõi. Dữ liệu được phân tích bằng hồi quy tuyến tính và ANOVA, với ngưỡng ý nghĩa $p < 0,05$.

Kết quả: Tất cả công thức duy trì mật độ vi sinh vật trên 10 log CFU/g sau 12 tháng, song tốc độ suy giảm khác biệt rõ rệt. Công thức A có mức giảm nhanh nhất, trong khi công thức B duy trì ổn định nhất. Bao bì nhôm phức hợp kiểm soát AW và hàm ẩm tốt hơn so với lọ thủy tinh, góp phần duy trì độ ổn định sinh học.

Kết luận: Độ ổn định bảo quản của bột đông khô *Bacillus clausii* chịu ảnh hưởng đồng thời bởi tá dược bảo vệ và bao bì. Công thức B kết hợp với bao bì nhôm phức hợp cho hiệu quả tối ưu, gợi ý hướng phát triển chế phẩm probiotic ổn định và bền vững hơn trong thực tiễn sản xuất.

Từ khóa: *Bacillus clausii*, đông khô, độ ổn định bảo quản, đóng gói.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bacillus clausii là chủng vi khuẩn sinh bào tử thuộc nhóm probiotic đã được sử dụng rộng rãi với các bằng chứng lâm sàng về hiệu quả hỗ trợ cân bằng hệ vi sinh đường ruột, giảm tiêu chảy và phòng ngừa rối loạn tiêu hóa [1-2]. Đặc điểm nổi bật của *Bacillus clausii* là khả năng tồn tại dưới dạng bào tử chịu được nhiệt độ và pH khắc nghiệt [1-3]. Tuy nhiên, thách thức lớn nhất trong phát triển chế phẩm probiotic là duy trì tính ổn định về số lượng vi sinh vật sống sót trong suốt thời hạn sử dụng sản phẩm [4]. Theo hướng dẫn ICH Q5C - Stability Testing of Biotechnological/Biological Products, việc nghiên cứu độ ổn định của các sản phẩm công nghệ sinh học không chỉ dừng lại ở đánh giá các chỉ tiêu hóa lý thông thường, mà còn phải tập trung vào khả năng sống sót [5]. Ngoài ra, Q5C cũng nhấn mạnh yêu cầu đánh giá toàn bộ hệ bao bì-nắp đậy (container-closure system), bởi đây là yếu tố trực tiếp ảnh hưởng đến độ ẩm, hoạt độ nước (AW) và từ đó quyết định mức độ ổn định sinh học của sản phẩm [5].

Nghiên cứu này được tiến hành với các mục tiêu đánh giá độ ổn định dài hạn của bột đông khô chứa *Bacillus clausii* theo hướng dẫn ICH Q5C trong hai loại bao bì: lọ thủy tinh và túi nhôm phức hợp.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là bột đông khô chứa *Bacillus clausii* (chủng M31) được sản xuất từ chủng được phân lập và lưu trữ tại Trung tâm Nghiên cứu và Kinh doanh Dược, Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương, có mật độ ban đầu đạt $> 10^{12}$ CFU/ml trong dịch nuôi cấy.

Các công thức bào chế được mã hóa thành phần:

- Công thức A (chất bảo vệ mannitol): công thức

*Tác giả liên hệ

Email: xuandt@gmail.com Điện thoại: (+84) 904607584 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3475>

tham chiếu (nền đơn chất).

- Công thức B (maltodextrin + trehalose): công thức cải tiến (đa chất bảo vệ).

- Công thức C (hỗn hợp 3 chất bảo vệ lạnh thay đổi tỷ lệ): công thức biến thể bổ sung.

Hai loại bao bì được sử dụng để so sánh:

- Lọ thủy tinh trung tính màu hổ phách, đóng kín bằng nút cao su và nắp nhôm.

- Túi nhôm phức hợp nhiều lớp, hàn kín, có đặc tính chống ẩm cao.

2.2. Chuẩn bị đông khô

Quy trình sản xuất bột đông khô được tiến hành như sau: dịch nuôi cấy *Bacillus clausii* được ly tâm để thu sinh khối; sinh khối được phân tán trong dung dịch tá được bảo vệ theo từng công thức; hỗn dịch được làm lạnh nhanh ở -80°C , sau đó chuyển sang giai đoạn sấy thăng hoa; quá trình đông khô diễn ra trong 48 giờ, dưới áp suất $< 0,1$ mbar, với dải nhiệt độ từ -50°C đến $+25^{\circ}\text{C}$; 3 lô độc lập được sản xuất cho mỗi công thức, bảo đảm tính đại diện và phù hợp khuyến cáo của ICH Q5C [5].

2.3. Điều kiện thử độ ổn định

Nghiên cứu độ ổn định được bố trí theo hướng dẫn ICH Q5C và ICH Q1A(R2) [5].

2.4. Chỉ tiêu chất lượng và phương pháp phân tích

- Số lượng vi sinh vật sống sót (CFU/g): xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường LB agar [4].

- Hàm ẩm dư (%): xác định bằng phương pháp Karl Fischer, yêu cầu $< 5\%$ [6].

- Hoạt độ nước (AW): đo bằng máy đo AW chuyên dụng, giới hạn $< 0,30$ [7].

- Đặc tính cảm quan: quan sát màu sắc, trạng thái, mùi.

- Độ phân tán: thử nghiệm hòa tan bột trong nước, ghi nhận thời gian phân tán hoàn toàn.

2.5. Phân tích số liệu

Hồi quy tuyến tính được sử dụng để mô hình hóa sự suy giảm log CFU/g theo thời gian. Phân tích phương sai (ANOVA) bằng SPSS để so sánh với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Số lượng vi sinh vật sống sót

Bảng 1. Số lượng vi sinh vật sống sót (log CFU/g) của các công thức theo thời gian

Thời gian					
Bao bì thủy tinh			Bao bì túi nhôm		
Công thức A	Công thức B	Công thức C	Công thức A	Công thức B	Công thức C
0 tháng (ngay sau đông khô)					
11,10 $\pm 0,10$	11,40 $\pm 0,10$	11,30 $\pm 0,10$	11,20 $\pm 0,10$	11,50 $\pm 0,08$	11,50 $\pm 0,08$
0,25 tháng (1 tuần)					
11,00 $\pm 0,08$	11,35 $\pm 0,08$	11,25 $\pm 0,08$	11,15 $\pm 0,08$	11,48 $\pm 0,07$	11,48 $\pm 0,07$
1					
10,90 $\pm 0,08$	11,30 $\pm 0,08$	11,20 $\pm 0,08$	11,10 $\pm 0,08$	11,45 $\pm 0,07$	11,45 $\pm 0,07$
3					
10,70 $\pm 0,09$	11,20 $\pm 0,08$	11,10 $\pm 0,08$	10,95 $\pm 0,08$	11,40 $\pm 0,07$	11,35 $\pm 0,07$
6					
10,45 $\pm 0,10$	11,05 $\pm 0,09$	10,95 $\pm 0,09$	10,80 $\pm 0,09$	11,30 $\pm 0,08$	11,25 $\pm 0,08$
9					
10,25 $\pm 0,10$	10,95 $\pm 0,09$	10,80 $\pm 0,09$	10,70 $\pm 0,09$	11,25 $\pm 0,08$	11,15 $\pm 0,08$
12					
10,10 $\pm 0,12$	10,90 $\pm 0,10$	10,70 $\pm 0,10$	10,60 $\pm 0,10$	11,20 $\pm 0,09$	11,10 $\pm 0,09$

Ngay sau khi đông khô, số lượng vi sinh vật sống sót của cả 3 công thức đều đạt trên 11 log CFU/g. Trong quá trình bảo quản, công thức A (mannitol đơn chất) giảm nhanh nhất, đặc biệt khi đóng trong lọ thủy tinh, chỉ còn khoảng $10,10 \pm 0,12$ log CFU/g sau 12 tháng. Công thức B (maltodextrin + trehalose) cho thấy độ ổn định cao nhất: ở cả hai loại bao bì, mật độ vi sinh vật vẫn duy trì gần như không đổi ($\geq 10,9$ log CFU/g với lọ thủy tinh và $\geq 11,2$ log CFU/g với túi nhôm sau 12 tháng). Công thức C (hỗn hợp 3 chất bảo vệ) có mức ổn định trung gian, tốt hơn công thức A nhưng thấp hơn công thức B. So sánh hai loại bao bì, túi nhôm phức hợp luôn cho kết quả cao hơn lọ thủy tinh, với mức suy giảm trung bình thấp hơn khoảng 0,3-0,5 log CFU/g sau 12 tháng.

3.2. Hàm ẩm dư và hoạt độ nước

Bảng 2. Hàm ẩm dư (H%) và hoạt độ nước (AW) của các công thức theo thời gian

Thời điểm	Chỉ tiêu	Bao bì thủy tinh			Bao bì túi nhôm		
		Công thức A	Công thức B	Công thức C	Công thức A	Công thức B	Công thức C
Ban đầu	Hoạt độ nước (AW)	$0,24 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
	Hàm ẩm (H%)	$4,40 \pm 0,05$	$3,50 \pm 0,04$	$3,60 \pm 0,04$	$2,80 \pm 0,03$	$2,70 \pm 0,03$	$2,75 \pm 0,03$
3 tháng	Hoạt độ nước (AW)	$0,26 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
	Hàm ẩm (H%)	$4,55 \pm 0,06$	$3,60 \pm 0,05$	$3,70 \pm 0,05$	$2,90 \pm 0,03$	$2,80 \pm 0,03$	$2,85 \pm 0,03$
6 tháng	Hoạt độ nước (AW)	$0,27 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
	Hàm ẩm (H%)	$4,60 \pm 0,06$	$3,70 \pm 0,05$	$3,75 \pm 0,05$	$2,95 \pm 0,03$	$2,85 \pm 0,03$	$2,90 \pm 0,03$
12 tháng	Hoạt độ nước (AW)	$0,28 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
	Hàm ẩm (H%)	$4,70 \pm 0,07$	$3,80 \pm 0,06$	$3,85 \pm 0,06$	$3,00 \pm 0,04$	$2,95 \pm 0,03$	$3,00 \pm 0,04$

Kết quả cho thấy tất cả các công thức đều duy trì hàm ẩm < 5% và hoạt độ nước < 0,30 AW trong suốt 12 tháng bảo quản, đáp ứng yêu cầu theo hướng dẫn ICH Q5C. Tuy nhiên, có sự khác biệt rõ rệt giữa hai loại bao bì:

- Bao bì thủy tinh: AW dao động từ 0,24-0,28, hàm ẩm tăng nhẹ từ $4,40 \pm 0,05\%$ lên $4,70 \pm 0,07\%$ sau 12 tháng. Điều này cho thấy khả năng kiểm soát ẩm

của lọ thủy tinh còn hạn chế, dẫn tới sự dao động nhất định trong quá trình bảo quản.

- Bao bì túi nhôm phức hợp: AW duy trì ổn định ở mức rất thấp (0,09-0,14), hàm ẩm chỉ tăng nhẹ từ 2,70-2,80% lên khoảng 3,0% sau 12 tháng. Sự ổn định này chứng minh hiệu quả chống ẩm vượt trội của nhôm phức hợp.

3.3. Đặc tính cảm quan và độ phân tán

Bảng 3. Đặc tính cảm quan và thời gian phân tán của các công thức theo thời gian

Thời gian	Bao bì thủy tinh			Bao bì túi nhôm		
	Công thức A	Công thức B	Công thức C	Công thức A	Công thức B	Công thức C
0 tháng (ngay sau đông khô)	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,5 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,0 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,2 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,3 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $2,8 \pm 0,1$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $2,9 \pm 0,1$ phút
3 tháng	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,7 \pm 0,3$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,1 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,3 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,4 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $2,9 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,0 \pm 0,2$ phút
6 tháng	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,8 \pm 0,3$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,2 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,4 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,5 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,0 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,1 \pm 0,2$ phút
12 tháng	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,9 \pm 0,3$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,3 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,5 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,6 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,1 \pm 0,2$ phút	Bột mịn, trắng ngà, không mùi lạ Phân tán: $3,2 \pm 0,2$ phút

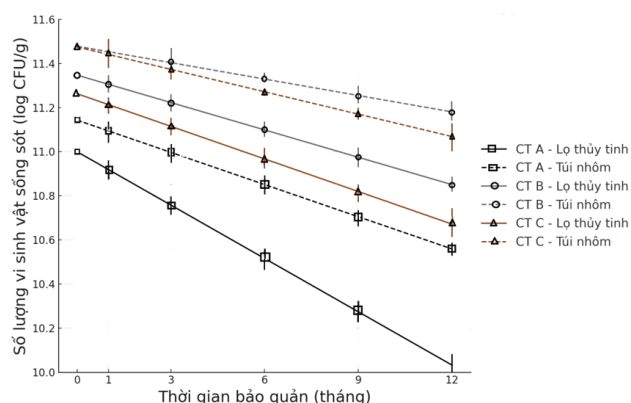
Tất cả các công thức đều duy trì đặc tính cảm quan ổn định trong suốt thời gian bảo quản. Thời gian phân tán tăng nhẹ theo thời gian, nhưng vẫn dưới 4 phút. Công thức B và C có khả năng phân tán nhanh hơn công thức A; đồng thời mẫu đóng trong túi nhôm luôn cho thời gian phân tán ngắn hơn so với lọ thủy tinh, thuận lợi hơn khi sử dụng lâm sàng.

3.4. Phân tích mô hình hồi quy tuyến tính

Bảng 4. Thông số mô hình hồi quy tuyến tính của các công thức (n = 3)

Công thức - Bao bì	Hệ số góc (slope, log CFU/tháng)	Intercept (log CFU/g)	R ²	p-value
Công thức A				
Lọ thủy tinh	-0,083	11,05	0,921	< 0,05
Túi nhôm	-0,050	11,15	0,915	< 0,05
Công thức B				
Lọ thủy tinh	-0,042	11,30	0,902	< 0,05
Túi nhôm	-0,025	11,45	0,896	< 0,05
Công thức C				
Lọ thủy tinh	-0,050	11,20	0,908	< 0,05
Túi nhôm	-0,033	11,35	0,901	< 0,05

Kết quả phân tích hồi quy tuyến tính cho thấy tốc độ suy giảm vi sinh vật sống sót khác biệt rõ rệt giữa các công thức và loại bao bì. Công thức A trong lọ thủy tinh có hệ số góc -0,083 log CFU/tháng, phản ánh tốc độ mất khả năng sống nhanh nhất. Ngược lại, công thức B trong túi nhôm có hệ số góc thấp nhất (-0,025 log CFU/tháng), ổn định gấp hơn 3 lần so với công thức A. Công thức C nằm ở mức trung gian giữa công thức A và công thức B. Tất cả mô hình đều có R² > 0,89 và ý nghĩa thống kê (p < 0,05), cho phép ngoại suy thời hạn bảo quản.



Hình 1. Mức độ suy giảm số lượng vi sinh vật sống sót theo thời gian trong các dạng bao bì khác nhau

Dựa trên mô hình, công thức B và C trong túi nhôm có thể duy trì ≥ 10 log CFU/g đến 12 tháng và tiềm năng mở rộng thời hạn bảo quản đến ≥ 24 tháng ở 25°C/60% RH.

4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu được thiết kế nhằm đánh giá độ ổn định bảo quản của bột đông khô *Bacillus clausii* theo chuẩn ICH Q5C [5]. Kết quả định lượng số lượng vi sinh vật sống sót cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức. Công thức A (mannitol đơn chất) có tốc độ suy giảm nhanh nhất, phản ánh hạn chế của mannitol vốn dễ kết tinh và gây bất ổn trong môi trường khô [6-7]. Ngược lại, công thức B (maltodextrin + trehalose) duy trì số lượng bào tử ổn định nhất, trên 11 log CFU/g sau 12 tháng, phù hợp với cơ chế bảo vệ kép: maltodextrin làm giảm biến động cấu trúc, trehalose ổn định màng và protein. Công thức C (hỗn hợp 3 tá dược) cho kết quả trung gian, cho thấy sự bổ sung đa chất có lợi nhưng hiệu quả chưa vượt trội so với công thức B [8].

Các chỉ số hỗ trợ (AW, hàm ẩm) củng cố kết quả CFU: bao bì thủy tinh cho thấy AW cao hơn và dao động nhiều hơn so với túi nhôm, dẫn tới tốc độ suy giảm CFU nhanh hơn. Túi nhôm phức hợp giữ AW ổn định ở mức thấp (0,09-0,14) và hàm ẩm < 3%, góp phần hạn chế biến động sinh học. Đặc tính cảm quan và thời gian phân tán nhìn chung ít thay đổi, nhưng vẫn ghi nhận sự khác biệt nhỏ: các mẫu bảo quản trong túi nhôm có thời gian phân tán ngắn hơn, thuận lợi cho sử dụng lâm sàng [9-10]. Phân tích hồi quy tuyến tính cho thấy slope suy giảm của công thức A cao nhất, trong khi công thức B thấp nhất, đặc biệt khi kết hợp với bao bì nhôm (slope -0,025 log CFU/tháng). Điều này khẳng định vai trò kết hợp của tá dược bảo vệ đa chất và hệ bao bì chống ẩm trong việc duy trì độ ổn định sinh học.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chứng minh rằng độ ổn định bảo quản của bột đông khô *Bacillus clausii* phụ thuộc đáng kể vào cả công thức và bao bì. Công thức chứa maltodextrin + trehalose (công thức B) khi bảo quản trong túi nhôm phức hợp duy trì được số lượng vi sinh vật sống sót cao nhất, cùng với AW và hàm ẩm ổn định, đáp ứng tốt hướng dẫn ICH Q5C. Kết quả này gợi ý rằng việc lựa chọn tá dược bảo vệ thích hợp kết hợp với bao bì chống ẩm có thể kéo dài thời hạn sử dụng chế phẩm probiotic, đồng thời nâng cao giá trị ứng dụng trong thực tiễn sản xuất và lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Cutting S.M. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol*, 2011, 28 (2): 214-20. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.007.
- [2] Ubaldi E, Gallelli L, D'Angelo L et al. Clinical efficacy of *Bacillus clausii* spores in children. *Minerva Pediatr*, 2015, 67 (5): 393-401.
- [3] Lopetuso L.R, Scaldaferri F, Franceschi F, Gasbarrini A. *Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives. *Front Immunol*, 2016, 7: 287. doi: 10.3389/fimmu.2016.00287.
- [4] Carvalho A.S, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata F.X, Gibbs P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy J*, 2004, 14 (10): 835-47. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.03.007.
- [5] International Conference on Harmonisation (ICH). *Stability testing of biotechnological/biological products Q5C*, Geneva: ICH, 1996.
- [6] Izutsu K, Yoshioka S, Terao T. Stabilization of proteins in freeze-dried amorphous mannitol. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41 (10): 1806-10. doi: 10.1248/cpb.41.1806.
- [7] Johnson R.E, Kirchhoff C.F, Gaudy R.S. Mannitol-sucrose mixtures: physical characterization and protein stabilization. *Pharm Res*, 2002, 19 (6): 901-8. doi: 10.1023/A:1015396609559.
- [8] Crowe J.H, Hoekstra F.A, Crowe L.M. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 2001, 43 (2): 89-105. doi: 10.1006/cryo.2001.2353.
- [9] Santivarangkna. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Drying Technol*, 2007, 25 (4): 695-706. doi: 10.1080/07373930701218242.
- [10] Dang H.T et al. Promising clinical and immunological efficacy of *Bacillus clausii* spore probiotics for supportive treatment of persistent diarrhea in children. *Sci Rep*, 2024, 14 (1): 6359. doi: 10.1038/s41598-024-56627-9