

## PROBIOTINIŲ PIENARŪGŠČIŲ BAKTERIJŲ LIOFILIZUOJAMŲ IR SAUGOMŲ ĮVAIRIOSE APSAUGINĖSE TERPĖSE GYVYBINGUMAS

Jonė Kantautaitė, Antanas Sederevičius, Vaidas Oberauskas, Ingrida Monkevičienė, Rasa Sutkevičienė, Jonas Laugalis, Rasa Želvytė

*Lietuvos veterinarijos akademija, Virškinimo fiziologijos ir patologijos mokslinis centras, Tilžės g. 18, 47181 Kaunas; tel. (8 ~ 370) 36 36 92, faksas (8 ~ 37) 36 24 17; el.paštas: jone.kantautaitė@lva.lt*

**Santrauka.** Liofilizuojamiems ir liofilizuotiems mikroorganizmų neigiamiems poveikiams (atšaldymui, nuvandenijimui, rehidracijai, ilgalaikiam saugojimui) sušvelninti, jų aktyvumui ir gyvybingumui palaikyti, naudojamos įvairios sudėties apsauginės terpės.

Išskyrę iš galvijų organizmo probiotines pienarūgščių bakterijų *L. fermentum* ir *L. plantarum* padermes, nustatėme penkių terpių apsauginį poveikį įvairiais liofilizacijos tarpsniais ir saugant vienerius metus. Mikroorganizmų biomasės kaupimui naudotas MRS selektyvinis sultinys (Liofilchem, Italija) įpilant 2% bakterijų kultūros. Stacionarinėje augimo fazėje sukonzentruota mikroorganizmų biomasė suspenduota 1:3 atitinkamos sudėties apsauginėmis terpėmis (Nr. 1; 2; 3; 4; 5). Terpių pagrindą sudarė neriebus pienas, įvairūs angliavandeniai ir kiti komponentai. Naudotas liofilizatorius GT-2 (Leybold-Heraeus, Vokietija). Liofilizuoti sandariai uždaryti produktai laikyti 12 mėn. +4°C temperatūroje. Gyvybingų laktobacilų kiekis nustatytas lėkštelių metodu, skaičiuojant kolonijas sudarančius vienetus (KSV) ant standžios mitybinės terpės – MRS agar (Liofilchem, Italija): užpylus apsaugine terpe; užšaldžius; liofilizavus ir 12 mėn. saugotus +4°C temperatūroje. Laktobacilų gyvybingumo kaita kiekvienoje apsauginėje terpėje įvertinta liofilizacijos metu, o rezultatai palyginti tarpusavyje. Nustatyta, kad *L. fermentum* Nr. 4 ir Nr. 5 terpėse išliko gana gyvybingas visais liofilizacijos tarpsniais. Jo gyvybingumas terpėje Nr. 4 palyginti su pradiniu kiekiu užšaldžius buvo 81,3%, liofilizavus – 72%, 12 mėn. saugoto – 66,5%, o terpėje Nr. 5 gyvybingų mikroorganizmų išliko atitinkamai 82,8%; 74,8%; ir 69,7%. Terpių esančios sudėtinės dalys teigiamai veikė mikroorganizmų gyvybingumą nepalankiomis aplinkos sąlygomis. *L. plantarum* padermei terpėje Nr.5 nustatyti geriausi gyvybingumo rezultatai: užšaldžius – 87,6%, liofilizavus – 76,5%, 12 mėn. saugoto – 75,3%.

**Raktažodžiai:** laktobacilos, probiotikai, liofilizacija, šaldymas, gyvybingumas, apsauginės terpės.

## VIABILITY OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA IN VARIOUS PROTECTIVE MEDIA DURING LYOPHILIZATION AND STORAGE

**Summary.** During the process of lyophilization and after it in order to soften the negative effects of various factors (chilling, dehydration, rehydration, long-term preservation) on microorganisms and to maintain their activity and viability protective media of different composition are used.

The strains of probiotic lactic acid bacteria *L. fermentum* and *L. plantarum* were isolated from the organism of cattle and the effect of five protective media during different stages of lyophilization and long-term preservation was studied. MRS selective broth was used for the accumulation of biomass (Liofilchem, Italy) with 2% of bacterial culture. The biomass of microorganisms concentrated during the stationary stage of growth was suspended 1:3 with protective media of certain composition (Nr 1; 2; 3; 4; 5), containing skimmed milk, various carbohydrates and other ingredients. The lyophilizer GT-2 (Leybold-Heraeus, Vokietija) was used. After the lyophilization tightly closed products were kept 12 months at the temperature of +4°C. The number of viable lactobacillus was studied by the plate method on rigid nutritive media – MRS agar (Liofilchem, Italy): under the protective media; after freezing; after lyophilization and after 12 month storage at the temperature of +4°C. The changes of lactobacillus viability were evaluated in each protective media at the different stages of lyophilization and the results were compared to other protective media studied. It was defined that the strain *L. fermentum* No.4 underwent all stages of lyophilization rather satisfactory. The percent of viability survival in the medium No.4 was 81.3% comparing to the initial amount after freezing; 72% - after lyophilization; 66.5% - after 12 month storage; respectively in the medium No.5 – 82.8%; 74.8%; 69.7%. The ingredients of these protective media demonstrated positive effect on the viability of microorganisms in unfavorable environmental conditions. The best survival was found for *L. plantarum* in the medium No.5 – respectively 87.6%; 76.5%; 75.3%.

**Keywords:** lactobacillus, probiotics, lyophilization, freezing, viability, protective media.

**Įvadas.** Mikroorganizmai, žmonių ir gyvūnų simbiotai sudaro vieningą ekologinę sistemą. Jie randami ant odos, burnos ertmėje, virškinimo, šlapimo, lytiniuose ir kvėpavimo takuose. Intensyvinant ekologiškų gyvulininkystės produktų gamybą, gerinant gyvulių sveikatingumą, veterinarijoje medicinoje vis dažniau taikomi profilaktikos ir gydymo

mikroorganizmais metodai, visuotinai veikiančys makroorganizmą. (Bendikas, Uhočkas, 1994; Асонов, Сидоров, 1998; Pieškus, 2000; Šimkus, 2001; Jatkauskas ir kt., 2003). Žemės ūkio gyvuliams bakteriniai preparatai – probiotikai duodami kaip pašariniai papildai, gerinantys pašarų pasisavinimą, dėl to gaunami didesni priesvoriai, padidėja produktyvumas. Probiotikais atstatoma naudinga

mikroflora po gydymo antibiotikais, chemoterapijos (Klaenhammer, 2000; Bakutis, Rutkoviene, 2000; Лапинскайте, Бабонос, 2003). Probiotikų Veiklusis pagrindas – iš sveikų gyvulių su pageidaujamos savybėmis išskirta įvairi naudinga mikroflora iki norimos koncentracijos, suspenduota įvairiose apsauginėse terpėse (Бовкун, и др., 1999; Жирков, Братухин, 1999; Тараканов, Николочева, 2000; Лапинскайте, Бабонос, 2003). Jų sudėtyje gali būti įvairios mikroorganizmų kombinacijos: bifidobakterijos, laktobakterijos, enterokokai, streptokokai, mielės, bacilos ir kt. Iš jų gaminami miltelių, tablečių, aerozolio, žvakučių formose preparatai. Dauguma preparatų naudojamų veterinarijoje ir medicinoje, paruošti liofilizacijos būdu juos džiovinant apsauginėse terpėse. Taip paruoštus preparatus patogai vartoti, transportuoti ir ilgai saugoti. Dėl liofilizacijos metu patiriamos streso mikroorganizmų gyvybingumas gali sumažėti, pakisti jų pageidaujamos savybės. Kai kuriems mikroorganizmams liofilizacija gali būti pražūtinga, tada pagamintas iš jų probiotikas gali neduoti pageidaujamo rezultato (Малик, Панин, 2001).

Neigiamam liofilizacijos poveikiui sumažinti naudojamos įvairios sudėties apsauginės terpės (Campagne, 2001). Taip apsaugojami mikroorganizmai įvairiais liofilizacijos etapais: šaldant produktą – nuo neigiamo susidariusių kristalų poveikio, kurie sukelia mechaninį membranos pažeidimą, vykstant eutektiniam druskų dalijimuisi ir kintant jų koncentracijai priklausomai nuo osmosinio slėgio; džiovinant – nuo perdžiovinimo; ilgai saugant – nuo neigiamo skilimo produktų poveikio (Trišic-Milanovic, Rordzic, 2001). Kad liofilizacijos metu mikroorganizmai patirtų kuo mažesnę stresą, laisvas vanduo šalinamas neigiamoje temperatūroje giliame vakuume. Vanduo šalinamas garų pavidalu, aplenkiant skystąją fazę. Surištas vanduo šalinamas teigiamoje temperatūroje. Taip mikroorganizmai išvengia baltymų denatūravimo, išsaugomos jų specifinės savybės. Tačiau gali pakisti mikroorganizmų dydis, pailgėti jų augimo logaritminė fazė arba visai jie gali neaugti kietoje mitybinėje terpėje (Промышленная микробиология, 1989). Tos pačios rūšies mikroorganizmų gyvybingumas vienodose apsauginėse terpėse gali būti skirtingas.

Efektyvių apsauginių terpių paieška aktuali ir šiandien. Kadangi į terapinių ir profilaktinių priemonių gretas vis labiau skverbiasi probiotikai, reikalinga numatyti sąlygas jiems išsaugoti. Dažniausiai naudojamos sudėtinės apsauginės terpės, kurių pagrindas dažnai yra periebus pienas (Баникова, 1982; Несчисляев, и др., 1998; Trišic-Milanovic, Rordzic, 2001). Vieni apsauginių terpių komponentai padeda išsaugoti mikroorganizmus šaldant, kiti – liofilizuojant, dar kiti – ilgai saugant. Naudojant kelias apsaugines terpes tam pačiam mikroorganizmui išsaugoti, galima geriau išanalizuoti jų poveikį įvairiais proceso tarpsniais.

**Darbo tikslas** – nustatyti laktobacilų *L. fermentum* ir *L. plantarum* gyvybingumą apsauginėse terpėse įvairiais liofilizacijos tarpsniais ir saugant jas 12 mėn.

**Medžiagos ir metodai.** Tyrimai atlikti Lietuvos veterinarijos akademijos Virškinimo fiziologijos ir patologijos mokslinio centro Mikrobiologijos

laboratorijoje. Mikroorganizmų biomasei kaupti naudotas MRS selektyvinis sultinys (Liofilchem, Italija) įpilant 2% *L. fermentum* ir *L. plantarum* bakterijų. Laktobacilos kultivuotos atskirai optimalioje augimo temperatūroje: *L. plantarum* +30°C, *L. fermentum* +37°C (Sederevičius ir kt., 2002). 18 – 20 val. kultivuoti mikroorganizmai stacionarinėje augimo fazėje atskirti nuo kultivavimo terpės centrifugavimo būdu laboratorine centrifuga (MLW - T62, Vokietija). Centrifuguota 4000 /aps min. 10 min. mikroorganizmų biomase suspenduota 1:3 atitinkamos sudėties apsauginėmis terpėmis (Nr. 1; 2; 3; 4; 5). Apsauginių terpių sudėtis buvo tokia:

- terpė Nr. 1 – sacharozė 10%, natrio acetatas 5%, želatina 1,5%, neriebus pienas;
- terpė Nr. 2 – laktozė 10%, natrio acetatas 5%, želatina 1,5%, neriebus pienas;
- terpė Nr. 3 – gliukozė 10%, natrio acetatas 5%, želatina 1,5%, neriebus pienas;
- terpė Nr. 4 – laktozė 5%, želatina 1,5%, glicerolis 1%, kalcio karbonatas 1%, neriebus pienas;
- terpė Nr. 5 – laktozė 5%, sacharozė 5%, peptonas 1%, askorbo rūgštis 0,2%, neriebus pienas.

Gautos mikroorganizmų suspensijos su įvairiomis apsauginėmis terpėmis išpilstytos į sterilius flakonius ir 12 val. laikytos šaldiklyje –40°C temperatūroje (Gorenje, Vokietija). Tada užšaldyta biomase 24 val. liofilizuota liofilizatoriuje GT-2 (Leybold-Heraeus, Vokietija). Liofilizacija pradėta –40°C temperatūroje. Proceso metu slėgis džiovinimo kameroje buvo 0,2 – 0,5 mm/Hg (t. y. žemiau eutektinės zonos visoms tiriamoms apsauginėms terpėms). Surištas vanduo šalintas teigiamoje temperatūroje. Etapo pabaigoje temperatūra buvo pakelta iki +35°C. Liofilizavus flakonai sandariai užkimšti kaštukais su metaline apsauga ir 12 mėn. laikyti buitiniame šaldytuve +4°C temperatūroje.

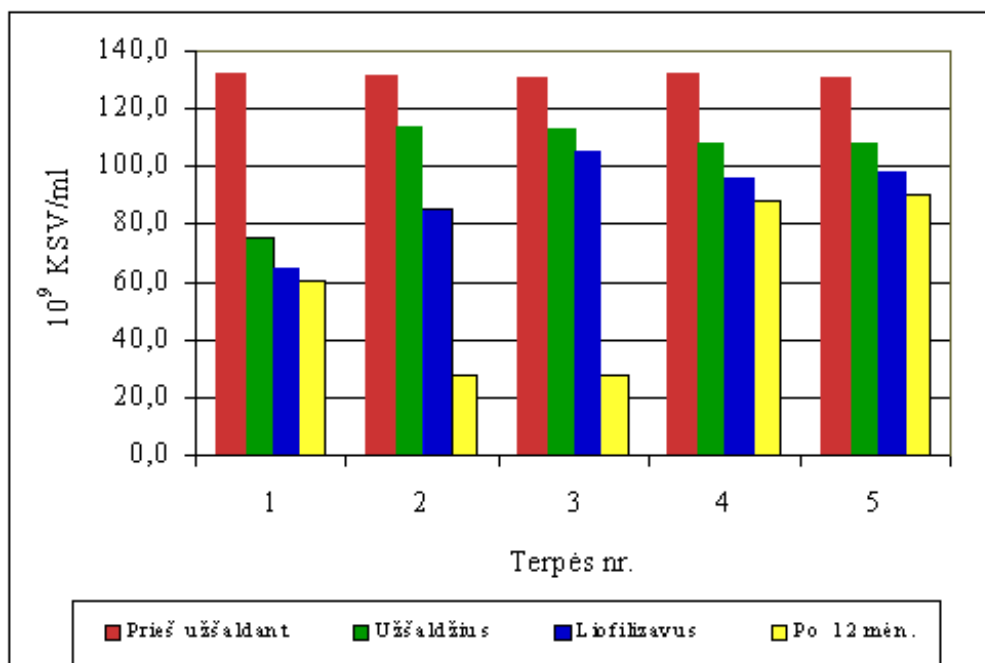
Gyvybingų laktobacilų kiekis nustatytas lėkštelių metodu, skaičiuojant kolonijas sudarančius vienetus (KSV) ant MRS agarų (Liofilchem, Italija). Nustatant gyvybingumą liofilizuota kultūra +20°C temperatūros steriliu distiliuotu vandeniu suspenduota iki pradinio tūrio. Skiesta klasikiniu būdu. Sėta Petri lėkštelėse ant MRS agarų ir 48 val. kultivuota *L. plantarum* +30°C temperatūroje, o *L. fermentum* +37°C temperatūroje CO<sub>2</sub> prisotintoje dujų aplinkoje. Gyvų laktobacilų kiekis 1 ml nustatytas suskaičiavus ant MRS agarų išaugusias kolonijas. Tyrimų rezultatai apskaičiuoti iš trijų analogiškų mėginių. Gyvybingų mikroorganizmų kiekis įvairiose terpėse vertintas: prieš užšaldant tik užpylus apsaugine terpe; užšaldžius; liofilizavus ir 12 mėn. saugojus +4°C temperatūroje. Laktobacilų gyvybingumo kaita įvertinta kiekvienoje apsauginėje terpėje liofilizacijos metu ir atitinkamai palyginta su kitomis apsauginėmis terpėmis. Nustatyta atskirų apsauginių terpių įtaka bakterijų gyvybingumui įvairiais liofilizacijos tarpsniais ir jas saugant. Liofilizuoto produkto likutinė drėgmė apskaičiuota pagal A. Januškevičių ir kitus tyrėjus (1999).

Rezultatai apdoroti statistinės analizės metodu Win Excel programa. (Juozaitienė, Kerzienė, 2001).

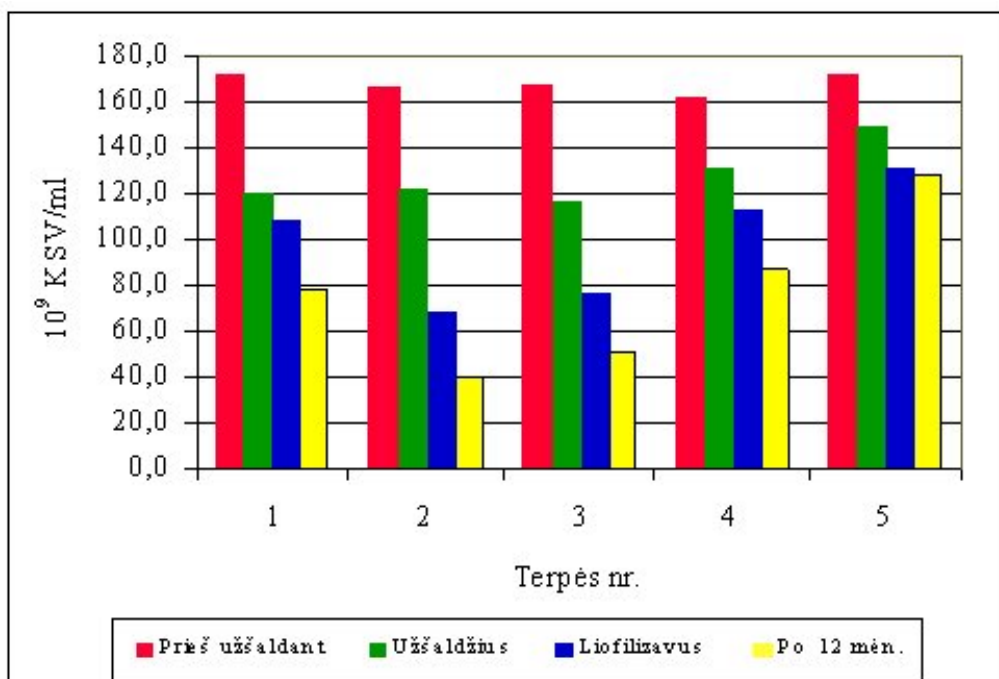
**Tyrimų rezultatai.** 1 ir 2 pav. matome, kad gyvų *L.*

*fermentum* mikroorganizmų, suspenduotų apsauginėmis terpėmis, buvo  $131,1 \pm 0,54 \times 10^9$ , *L. plantarum* –  $167,3 \pm 1,98 \times 10^9$ . Auginant kultūras MRS sultinyje, daugiau mikroorganizmų gauta kultivuojant *L. plantarum* nei *L. fermentum* bakterijas. Liofilizacijos ir tolesnio bakterijų saugojimo metu daugiau gyvybingų *L.*

*fermentum* bakterijų išliko terpėse Nr. 4 ir Nr. 5. Palyginus su pradiniu kiekiu, *L. fermentum* padermės gyvybingumas terpėje Nr. 4 užšaldymo buvo 81,3%; liofilizavus – 72%; po 12 mėn. saugojimo – 66,5%. *L. fermentum* padermės gyvybingumas terpėje Nr. 5 atitinkamai buvo 82,8%; 74,8%; ir 69,7%.



1 pav. *L. fermentum* gyvybingumas įvairiose apsauginėse terpėse



2 pav. *L. plantarum* gyvybingumas įvairiose apsauginėse terpėse

Neigiamas šaldymo poveikis nustatytas, kultivuojant *L. fermentum* bakterijas terpėje Nr. 1. Palyginti su pradiniu kiekiu gyvybingų mikroorganizmų rasta tik 56,8%. Terpėse Nr. 2 ir Nr. 3 gyvybingumas po šaldymo buvo

gana didelis – atitinkamai 86,6% ir 86,9%.

Didesnis neigiamas liofilizacijos poveikis *L. fermentum* padermei nustatytas terpėje Nr. 2, kur gyvybingumas siekė 75,1%. Tuo tarpu liofilizuojant

apsauginėse terpėse Nr. 1, 4 ir 5, *L. fermentum* gyvybingumas siekė atitinkamai 85,7%; 88,6% ir 90,4%, palyginti su rodikliu užšaldžius. Terpėje Nr. 3 *L. fermentum* liofilizacijos metu patyrė mažiausius nuostolius – 92,9%.

Saugojimo metu daugiausia šių mikroorganizmų neteko apsauginės terpės Nr. 2 ir Nr. 3. Terpėje Nr. 2, gyvybingų mikroorganizmų rasta 32,4%, terpėje Nr. 3 – 26,4%. Kitose terpėse saugant 12 mėn. gyvybingumas svyravo nuo 92 iki 94%

Visais tyrimo etapais (2 pav.) terpėje Nr. 5 gauti patys geriausi *L. plantarum* gyvybingumo rezultatai. Palyginti su pradiniu kiekiu gyvybingų mikroorganizmų išliko: užšaldžius – 87,6%, po liofilizavus – 76,5%, po 12 mėn. saugojimo – 75,3%. Užšaldžius kitose apsauginėse terpėse mikroorganizmų gyvybingumas buvo nuo 69% iki 80% ribose. Liofilizacijos procese mažiausias *L. plantarum* padermės gyvybingumas nustatytas terpėse Nr. 2 ir Nr. 3. Jose mikroorganizmų gyvybingumas buvo atitinkamai 56,2% ir 64%, kai tuo tarpu terpėse Nr. 1 ir 4 svyravo nuo 86% iki 88%.

Lyginant abiejų padermių rezultatus nustatyta, kad užšaldant mažiausi *L. fermentum* nuostoliai buvo terpėse Nr. 2 ir Nr. 3, o *L. plantarum* – terpėse Nr. 4 ir 5. Užšaldymo metu terpėse Nr. 2 ir 3 netenkama apie 13% *L. fermentum* gyvybingumo, o *L. plantarum* terpėse Nr. 4 ir 5 – 13% – 20%. Šių terpių apsauginiai komponentai pasižymėjo geru poveikiu, susidarius mikroorganizmams nepalankioms aplinkos sąlygoms. Užšaldymo metu terpėse Nr. 1 *L. fermentum* ir *L. plantarum* padermių sumažėjo atitinkamai 43,2% ir 30,2%.

Liofilizuojant *L. plantarum* apsauginėje terpėje Nr. 1 gyvybingų mikroorganizmų išliko daugiau, nei toje pačioje terpėje *L. fermentum*. Didelius gyvybingumo nuostolius liofilizacijos metu terpėje Nr. 2 patiria abi padermės.

Tirtose apsauginėse terpėse liofilizuotų produktų likutinė drėgmė svyravo nuo 1,5% iki 4,8%.

**Aptarimas ir išvados.** Vertinant liofilizuotų biopreparatų kokybę nustatoma, kaip pasisekė išsaugoti mikroorganizmų gyvybingumą ir pagrindines pageidaujamas jų savybes. Ankstyvesni mūsų tyrimai parodė, kad liofilizuojant išlieka tokios tiriamų pienarūgščių bakterijų pageidaujamos savybės: antagonistinis aktyvumas, jautrumas antibiotikams, atsparumas tulžiai (Sederevičius ir kt., 2002). Liofilizacijos metu gali žūti 10 – 50% ir daugiau mikroorganizmų, pirmuosius 12 mėn. – apie 30% (Звягин и др., 1981). Sultiniai, serumai, natrio druskos, gliutamino askorbo rūgštys ir kt. pasižymi apsauginiu poveikiu, padeda bakterijoms išlikti džiovinant ir saugant. Smulkūs molekuliniai junginiai – mono- ir disacharidai patekę į mikroorganizmo vidų ir sudarę ten osmosinį slėgį, ištirpina metabolitus, džiovinimo metu apsaugo ląstelės apvalkalėlį nuo trūkinėjimo neleidžia peržiūti medžiagai. Didelio molekulinio svorio baltymai ir kiti polimerai nepatenka į ląstelės vidų, bet palaiko osmosinį slėgį ne ląstelės viduje. Šie baltymai ląstelės rehidratacijos metu priverčia sublimuoto mikroorganizmo membraną geriau priglusti prie plazmos (Промышленная

микробиология, 1989).

Terpių apsauginės savybės priklauso ir nuo mikroorganizmo struktūros, fizinių bei cheminių veiksnių (Асонов, 2001). Net tos pačios rūšies mikroorganizmai labiau gyvybingi gali išlikti skirtingos sudėties apsauginėse terpėse. Naudojant tuo pačiu metu kelias apsaugines terpes, galima nustatyti jų sudėtinių dalių poveikį visais liofilizacijos tarpniais. Papildytose terpėse išaugintos kultūros atsparesnės nepalankiems veiksniams. Mūsų tirtų apsauginių terpių pagrindą sudarė neriebus pienas. Pirmųjų trijų (Nr. 1; 2; 3) sudėtyje buvo skirtingi angliavandeniai: – sacharozė, laktozė, gliukozė, kiti komponentai buvo tie patys. Apsauginiai komponentai terpėje Nr. 4 buvo glicerolis, terpėje Nr. 5 buvo peptonas ir askorbo rūgštis. Nustatyta, kad liofilizuotos *L. fermentum* padermės gyvybingumas tirtose terpėse buvo: Nr. 1 – 48,7%, terpėje Nr. 2 – 65%, Nr. 3 – 80,8%, Nr. 4 – 72%, Nr. 5 – 74,8%; *L. plantarum* gyvybingumas atitinkamai buvo 62%, 41,6%, 44,5%, 69,5% ir 76,5%. Ilgai saugant liofilizuotus mikroorganizmus aukštesnėje nereguliuojamoje temperatūroje apsauginių terpių sudėtyje esanti gliukozė skyla sudarydama karbonines grupes, kurios yra toksiškos mikroorganizmams, dėl to jų gyvybingumas smarkiai sumažėja. Mūsų tyrimų duomenimis, liofilizuotą produktą laikant +4°C temperatūroje terpėje Nr. 3, į kurios sudėtį įėjo gliukozė *L. fermentum* gyvybingumas labai sumažėjo (26,4%), bet *L. plantarum* liko gana gyvybingas (67,8%). Kaip teigia Баникова (1982) gliukozę pakeitus sacharozę bakterijų gyvybingumas saugojimo metu išlieka ilgiau. Mūsų tyrimais nustatyta, kad liofilizavus terpėje su sacharozę *L. fermentum* gyvybingumas buvo mažesnis (48,7%), nei kitose apsauginėse terpėse. Apsauginėje terpėje Nr. 1 *L. plantarum* užšaldymo ir liofilizacijos etape buvo gyvybingesnės, nei *L. fermentum* bakterijos. Terpės Nr. 1, 2, 3, kurių sudėtyje buvo sacharozė, laktozė, gliukozė, želatina, natrio acetatas geru apsauginiu poveikiu pasižymėjo šaldymo ir liofilizacijos etape.

Terpių Nr. 4 ir Nr. 5 komponentai liofilizuotas bakterijas nuo žuvimo geriau apsaugojo laikant 12 mėn. +4°C temperatūroje, atitinkamai: *L. fermentum* 92,3% ir 93,1%, *L. plantarum* 77,3% ir 98,5%. Vanduo likęs po sublimacijos, daro įtaką ne tik ląstelių gyvybingumui tuoj po liofilizavimo, bet ir laikymo metu. Sausi liofilizuoti produktai saugojimo metu buvo sandariai uždaryti. Mūsų tirtų liofilizuotų produktų likutinė drėgmė svyravo 1,5-5% ribose. Šis drėgmės kiekis yra tinkamas bakterijoms (Баникова; 1982). Tinkamai laikant ilgiau išsaugomos mikroorganizmų biologinės, fizinės ir cheminės savybės. Sumažinus vandens kiekį, kuris griežtai lokalizuojasi ir yra glaudžiai susijęs su ląstelės struktūromis (iki 2 – 5%), atskiros biocheminės reakcijos pristabdomos arba vyksta labai lėtai. Likutinės drėgmės optimumas svyruoja priklausomai nuo mikroorganizmo rūšies, fiziologinės būklės, terpės, kurioje mikroorganizmai džiovinami sudėties. Biologiniuose preparatuose optimali likutinė drėgmė 1 – 6%.

Liofilizuotą produktą saugant nereguliuojamos temperatūros patalpoje, mikroorganizmai greičiau žūna, susilpnėja jų aktyvumas. Saugant aukštesnėje kaip +10°C

temperatūroje, mikroorganizmų gyvybingumas per 12 mėn. sumažėja 2 – 3 kartus. Kuo žemesnė laikymo temperatūra, tuo daugiau bakterijų išlieka. Laikant produktą šviesoje, gyvybingumas taip pat labai sumažėja. (Промышленная микробиология, 1989).

Norint naudotis išskirtais mikroorganizmais, būtina maksimaliai išsaugoti jų gyvybingumą ir savybes. Todėl ir ateityje tikslinga tirti aplinkos įtaką mikroorganizmams, nustatyti palankias sąlygas jiems išsaugoti.

#### Išvados.

1. Terpėse Nr. 4 ir 5 esantys apsauginiai komponentai pasižymėjo teigiamu poveikiu padermių gyvybingumui liofilizacijos metu (*L. fermentum* 72 – 74% ir *L. plantarum* 69 – 76%) ir 12 mėn. saugant (*L. fermentum* 92 – 93% ir *L. plantarum* 77 – 98%).

2. Terpėse Nr. 2 ir 3 esantys angliavandeniai – gliukozė ir laktozė – bakterijų liofilizacijos eigoje pasižymėjo geru apsauginiu poveikiu (gyvybingumas: *L. fermentum* 65 – 80% ir *L. plantarum* 41 – 44%), tačiau daug *L. fermentum* mikroorganizmų netenkama saugant 12 mėn. – 26. – 36%.

#### Literatūra

1. Bakutis B., Rutkoviėnė V. Ekologinė gyvulininkystė. Reikalavimai ir rekomendacijos, Kaunas 2000. 12. p.

2. Bendikas P., Uchockis V. Pieno rūgšties bakterinio preparato ir gyvū mielių kultūros efektyvumas veršelių racionuose. Aktualios gyvulininkystės ir veterinarijos problemos. Pranešimų tezės. Kaunas, 1994. 35. p.

3. Campagne C. P. The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze-drying. Electronic Journal of Biotechnology. 2001. Vol.4. No.3; P. 1 – 7.

4. Januškevičius A., Kulpys J., Vaičiulaitienė O. Zootechninė pašarų analizė. Kaunas, 1999. 19. p.

5. Jatkauskas J., Vrotniakienė V., Kulpys J. Žolinių pašarų koncervavimo kryptys ir silosavimo priedų efektyvumas. Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija, 2003. T. 22 (44). P. 35 – 39.

6. Juozaitienė V., Kerzienė S. Biometrija ir kompiuterinė duomenų analizė. Kaunas, 2001. 114 p.

7. Klaenhammer T. Probiotic Bacteria: Today and Tomorrow. Journal of Nutrition 2000. Vol. 130. N. 2. 415 – 416. p.

8. Pieškus J. Veterinarinės imunologijos pagrindai. Lietuvos veterinarijos akademija. 2000. 151 p.

9. Sederevičius A., Oberauskas V., Kantautaitė J. ir kt. Daugkartinės liofilizacijos įtaka probiotinėms laktodacilų savybėms. Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija, 2002. T. 20 (42). 44 – 50. p.

10. Šimkus A. Probiotikų naudojimas veršelių racionuose. Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija, 2001. T. 16 (38). 137-139. p.

11. Trišić-Milanovic N., Rordzic A. The influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria. J. Serb. Chem. Soc. 2001 Vol. 66 (7). P.435 – 441.

12. Асонов Н. Р. Микробиология. М., Колос. 2001. С. 351.

13. Асонов Н. Р. Сидоров М. А. Биотехнология пробиотиков ветеринарного назначения. Аграр. наука. 1998. №3. С. 20 – 21.

14. Баникова Л. А. Управление процессами культивирования микроорганизмов заквасок и кисломолочных продуктов. М. 1982. С. 127.

15. Бовкун Г. Ф., Семенихина В. Ф., Ткачев Н. Д. Лечебное действие Бифинорма при микробиологических нарушениях кишечника у телят. Ветеринария. 1999. №. 4. С. 39 – 40.

16. Жирков И. Н., Братухин И. И. Применение пробиотика РАС для коррекции дисбактериоз у телят. Ветеринария. №. 4. 1999. С. 40 – 43.

17. Лапинскайте Р., Бабонос И. Эффективность применения симбионтного эубиотина STF. Ветеринария. 2003. №3. С. 22 – 26.

18. Малик Н. И., Панин А. Н. Ветеринарные пробиотические препараты. Ветеринария. 2001. №.10. С. 46 – 48.

19. Несчислаев В. А., Вдовина Г. П., Пугнин Н. Н. Разработка способов стабилизации биомассы при изготовлении лекарственных форм лактобактерина. Ж. микроб. эпид. иммунол. 1998 №2. С. 24 – 27.

20. Несчислаев В. А. Пробиотики: Ретроспектива, проблемы и достижение научно производственной практики. Ж. микроб. эпид. иммунол. НПО < Биомед > 1998. №2. С. 100 – 102.

21. Промышленная микробиология (ред. Егоров Н. С.) Москва: Высшая школа. 1989. С. 686.

22. Тараканов Б. В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных. Ветеринария. 2000. №. 1. С. 47 – 55.

23. Тараканов Б. В., Николичева Т. А. Новые биопрепараты для ветеринарии. Ветеринария. 2000. №. 7. С. 45 – 50.

24. Звягин И. В. Хорьков И. А. Токарин Э. Ф. и др. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания биологических препаратов. М. 1981. С. 33.