

KAI KURIŲ VEIKSNIŲ ĮTAKA LIOFILIZUOTŲ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IR *LACTOBACILLUS FERMENTUM* GYVYBINGUMUI

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

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

Santrauka. Darbo tikslas buvo nustatyti pienarūgščių bakterijų *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus fermentum* amžiaus, koncentravimo būdo ir apsauginių terpių įtaką gyvybingumui po liofilizacijos.

Buvo tiriamos 18 ir 48 val. amžiaus *L. plantarum* ir *L. fermentum* mikroorganizmų kultūros, koncentruotos dviem būdais—centrifuguojant ir nupilant kultivavimo terpę nuo savaime nusėdusių mikroorganizmų. Nusėdus suspenduotos skirtingos sudėties apsauginėmis terpėmis (Nr. 1, 2, 3, 4 ir 5) santykiu 1:3. Apsauginių terpių sudėtyje buvo neriebus pienas, įvairūs angliavandeniai ir kiti komponentai. Kultūros liofilizuotos liofilizatoriumi GT-2 (Leybold-Heraeus, Vokietija). Gyvybingų mikroorganizmų kiekis nustatytas skaičiuojant ant MRS (Oxoid) agaro išaugusias kolonijas.

Nustatyta, kad *L. fermentum* gyvybingumas priklauso nuo jų amžiaus. Po liofilizacijos visose tirtose terpėse gyvybingų 18 val. amžiaus *L. fermentum* mikroorganizmų buvo 6% ($p>0,1$) – 32% ($p<0,01$) daugiau nei 48 val. amžiaus mikroorganizmų. Tuo tarpu *L. plantarum* mikroorganizmų amžius įtakos gyvybingumui neturėjo. Mikroorganizmų koncentravimo būdas nedarė įtakos nei *L. fermentum*, nei *L. plantarum* gyvybingumui, tačiau liofilizuotų mikroorganizmų gyvybingumas priklausė nuo apsauginių terpių sudėties. Terpėje Nr. 5, kurią sudarė pienas, sacharozė, laktozė, peptonas ir askorbo rūgštis, gyvybingų mikroorganizmų išliko 18% ($p<0,05$) – 35% ($p<0,01$) daugiau nei kitose tirtose terpėse.

Išanalizavus gautus rezultatus galima daryti išvadą, kad norint liofilizacijos metu išsaugoti daugiau gyvybingų mikroorganizmų, būtina atsižvelgti į jų amžių ir apsauginės terpės sudėtį.

Raktažodžiai: liofilizacija, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, amžius, gyvybingumas, centrifugavimas, apsauginės terpės.

THE IMPACT OF SOME FACTORS ON THE VIABILITY OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND *LACTOBACILLUS FERMENTUM* STRAINS DURING THE PROCESS OF LYOPHILIZATION

Summary. The present study was designed to assess the impact of different protective media, the method of concentration and the age of the lactate-fermenting bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on their viability during the lyophilization.

The cultures of *L. plantarum* and *L. fermentum* of 18 and 48 hour age were studied. For the concentration of these cultures the following methods were used: centrifugation and removal of the cultivative medium from the spontaneously precipitated microorganisms. The precipitates were suspended 1:3 with the protective media (No. 1, 2, 3, 4 and 5), containing skimmed milk, various carbohydrates and other ingredients. The number of viable microorganisms was studied on rigid nutritive medium - MRS agar (Liofilchem-Italy). The lyophilizer GT-2 (Leybold-Heraeus, Germany) was used for the lyophilization.

It was defined that the viability of *L. fermentum* strain depends on their age. The number of viable microorganisms *L. fermentum* in 18 hour age culture was from 6% ($p>0.1$) to 32% ($p<0.01$) higher than in 48 hour age culture after the lyophilization in all media tested, although the age of *L. plantarum* strain had no impact on their viability. The methods of concentration used for the cultures of *L. fermentum* and *L. plantarum* strains had no effect on their viability. However, the viability of studied microorganism strains during lyophilization depends on the composition of protective media used. The number of viable microorganisms in the media No. 5, which contained milk, saccharose, lactose, ascorbic acid and peptone, was from 18% ($p<0.05$) to 35% ($p<0.01$) higher than in other studied media.

The analysis of the results leads to the conclusion, that in order to save as many as possible viable microorganisms during the process of lyophilization it is necessary to pay attention to the age of microorganisms and the composition of protective media.

Keywords: lyophilization, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, age, viability, centrifugation, protective media.

Įvadas. Naudingi mikroorganizmai biologiškai aktyvių medžiagų producentai dėl visuotinio poveikio makroorganizmui vis dažniau pritaikomi maisto, vaistų pramonėje, pašarų gamyboje (Bakutis, Rutkovičienė, 2000; Jatkauskas ir kt., 2003; Klaenhammer, 2000; Sederevičius

ir kt., 2001; Данилевская и др., 2003; Лапинская и др., 2003; Малик, Панин, 2001; Несчислаев и др., 1998; Сорокулова, и др., 1997) Dauguma naudingų mikroorganizmų, skirtingai nei patogeniniai, yra jautrūs įvairiems aplinkos veiksniams (Поздеев, Покровский,

1999) Nuo susidariusių sąlygų priklauso jų gyvybingumo ir savybių išlikimas.

Siekiant maksimaliai išsaugoti pageidaujamų mikroorganizmų gyvybingumą ir savybes, būtina nustatyti optimalias ilgalaikio saugojimo sąlygas. Tačiau po kiekvieno konservavimo būdo gali pakisti mikroorganizmų gyvybingumas, antibiotinės ir biocheminės savybės (Еропов, 1989, Поздеев, Покровский, 1999).

Pastaruoju metu maisto bei farmacinėje pramonėje naudojamos įvairios komercinės liofilizuotos kultūros. Liofilizuotų mikroorganizmų kolekcijų gyvybingumas ir kitos savybės gali išlikti nepakitusios 25 metus ir ilgiau. Taip paruoštus mikroorganizmus patogiu naudoti, išvengiama kontaminacijos pašaline mikroflora, juos atgaivinus iš anabiozės būsenos maksimaliai išsaugomos svarbiausios pageidaujamos savybės. Liofilizuota kultūra gerai tirpsta vandenyje, greitai atsistato jos savybės. Tačiau liofilizacijos metu mikroorganizmams daro įtaką įvairūs neigiami veiksniai – šaldymas, džiovinimas, kintantis osmosinis slėgis ir elektrolitų koncentracija. Dėl to neatsparios mikroorganizmų rūšys, neturinčios apsauginių medžiagų, pakinta, t. y. sumažėja ne tik jų gyvybingumas, bet suardoma ir ląstelių struktūra (Еропов, 1989; Малик, Панин, 2001). Liofilizuojamų mikroorganizmų atsparumui padidinti naudojamos apsauginės terpės, kuriomis prieš liofilizuojant mikroorganizmai suspenduojami (Банникова, 1982). Sudėtiniai tokių terpių komponentai dažnai yra neriebus pienas, augalinės kilmės agaras, želatina, kraujo serumai, angliavandenių tirpalai, baltymų hidrolizės produktai, mikroelementai (Trišic-Milanovic, Rordzic, 2001).

Darbo tikslas – nustatyti liofilizuotų pienarūgščių bakterijų *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus fermentum* amžiaus, koncentravimo būdo ir apsauginių terpių įtaką jų gyvybingumui.

Medžiaga ir metodai. Tyrimai atlikti LVA Virškinimo fiziologijos ir patologijos mokslinio centro Mikrobiologijos laboratorijoje su dviem laktobacilų *L. plantarum* ir *L. fermentum* padermėmis. 18 ir 48 val. amžiaus laktobacilų biomase gauta padermes kultivuojant

MRS selektyviniame sultinyje (Liofilchem, Italija) optimalioje augimo temperatūroje (Sederevičius ir kt., 2001). Laboratorine centrifuga MLW – T62 (Vokietija) 4000 aps./min. mikroorganizmai koncentruoti 10 min. Kitas mikroorganizmų koncentravimo būdas – kultivavimo terpės nupylimas nuo savaime nusėdusių mikroorganizmų. Abiem koncentravimo būdais gautos mikroorganizmų nuosėdos suspenduotos apsauginėmis terpėmis Nr. 1, 2, 3, 4 ir 5 santykiu 1:3. Apsauginių terpių sudėtis pateikta 1 lentelėje.

Gautos bakterijų suspensijos išpilstytos į sterilius flakonus ir užšaldytos šaldiklyje (Gorenje, Vokietija) – 40°C temperatūroje. Flakonai po 12 val. buvo sudėti į liofilizatorių GT-2 (Leybold-Heraeus, Vokietija), mikroorganizmų liofilizacija pradėta –40°C temperatūroje, baigta po 24 val. +35°C temperatūroje.

Gyvybingų mikroorganizmų kiekis nustatytas skaičiuojant ant MRS (Oxoid) agaro išaugusias kolonijas. Jų kiekis išreikštas kolonijas sudarančiais vienetais 1 ml mikroorganizmų suspensijos (KSV/ml). Kultūrų suspensijos skiestos klasikiniu būdu iki 10⁻¹¹. Gyvybingų mikroorganizmų procentas apskaičiuotas palyginus išlikusių liofilizuotų gyvybingų mikroorganizmų kiekį su pradiniu, nustatytu mikroorganizmus suspendavus apsauginėmis terpėmis. Tiriant liofilizuotų mikroorganizmų gyvybingumą, kultūra buvo rehidratuota steriliu +20°C temperatūros distiliuotu vandeniu iki pradinio tūrio. Sterilus distiliuotas vanduo mikroorganizmų reaktyvacijai naudotas, kad liofilizuotuose produktuose nepadidėtų elektrolitų koncentracija (Еропов, 1989).

Tyrimų rezultatai apskaičiuoti iš 3 analogiškų mėginių ir apdoroti statistinės analizės metodu Win Excel programa. (Juozaitienė, Kerzienė, 2001).

Tyrimo rezultatai. *L. fermentum* pienarūgščių bakterijų gyvybingumo tyrimo rezultatai pateikti 2 ir 3 lentelėje, *L. plantarum* – 4 ir 5 lentelėje.

Įvairiose apsauginėse terpėse prieš liofilizaciją atskirų amžiaus grupių mikroorganizmų, koncentruotų centrifugavimo ir nupylimo būdu, kiekis kito nežymiai (p>0,1).

1 lentelė. Apsauginių terpių sudėtis

Terpių komponentai	Terpių sudėtis, %				
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5
Pienas	83,5	83,5	83,5	96,5	88,8
Laktozė	-	10	-	5	5
Sacharozė	10	-	-	-	5
Gliukozė	-	-	10	-	-
Peptonas	-	-	-	-	1
Glicerolis	-	-	-	1	-
Kalcio karbonatas	-	-	-	1	-
Askorbo rūgštis	-	-	-	-	0,2
Natrio acetatas	5	5	5	-	-
Želatina	1,5	1,5	1,5	1,5	-

Prieš liofilizaciją suspenduotų apsauginėmis terpėmis 18 val. amžiaus *L. fermentum* ir *L. plantarum* mikroorganizmų, koncentruotų centrifugavimo būdu,

buvo atitinkamai 9% ir 11% daugiau nei naudojant nupylimo būdą. 48 val. amžiaus centrifuguotų mikroorganizmų atitinkamai buvo 30% ir 11% daugiau,

nei nuo jų nupylus kultivavimo terpę.

Po liofilizacijos 18 val. amžiaus gyvybingų *L. fermentum* mikroorganizmų, koncentruotų centrifuguojant terpėse Nr. 3, 4 ir 5, buvo atitinkamai 24,6% ($p < 0,01$), 1,5% ($p > 0,1$) ir 5,1% ($p > 0,1$) daugiau, nei nuo jų nupylus kultivavimo terpę (1 ir 2 pav.). Tuo tarpu terpėse Nr. 1 ir 2 atitinkamai nustatyta 2,1% ($p > 0,1$) ir 1,4% ($p > 0,1$) daugiau gyvybingų mikroorganizmų nupylus nuo jų

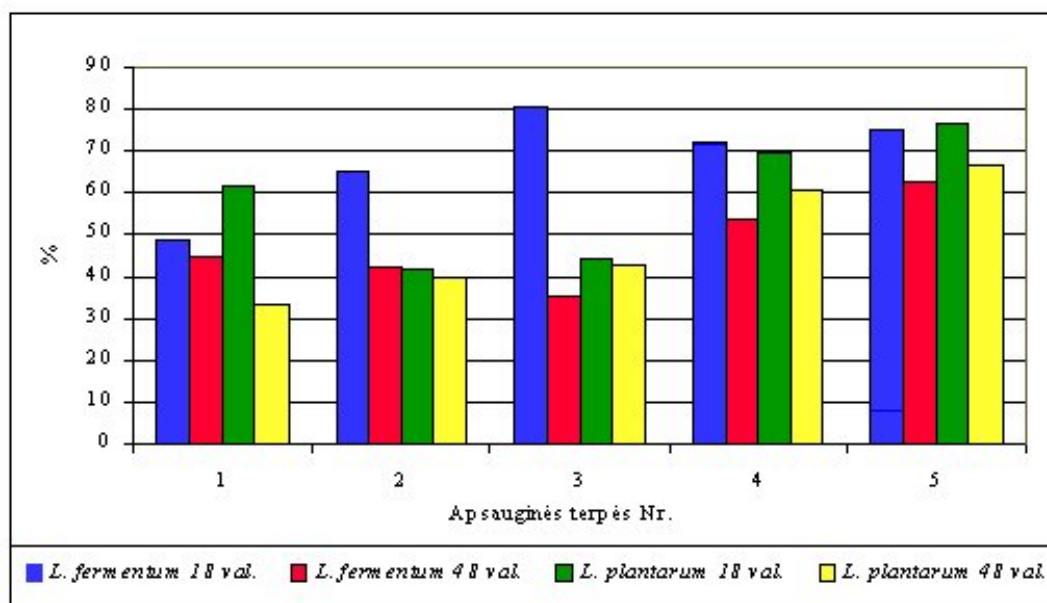
kultivavimo terpę. 48 val. amžiaus *L. fermentum*, koncentruotiems centrifuguojant apsauginėse terpėse Nr. 1, 2, 4 ir 5 nustatyta, atitinkamai 3,7% ($p > 0,1$), 0,1% ($p > 0,1$), 2,0% ($p > 0,1$) ir 4,6% ($p > 0,1$) daugiau gyvybingų mikroorganizmų, nei nuo jų nupylant kultivavimo terpę. Terpėje Nr. 3 gyvybingų mikroorganizmų buvo 2,5% ($p > 0,1$) daugiau kai nuo jų nupilta kultivavimo terpė.

2 lentelė. *L. fermentum* kiekio tyrimo rezultatai prieš liofilizuojant

Terpės	Bakterijų kiekis, $\times 10^9$ KSV/ml			
	Centrifugavimo būdas		Nupylimo būdas	
	18 val. amžius	48 val. amžius	18 val. amžius	48 val. amžius
Nr. 1	132,3 \pm 8,9	134,3 \pm 1,5	118,3 \pm 1,8	96,0 \pm 6,5
Nr. 2	131,3 \pm 1,8	134,7 \pm 4,3	122,0 \pm 5,8	92,7 \pm 3,5
Nr. 3	130,0 \pm 2,1	136,3 \pm 1,8	121,0 \pm 5,3	95,7 \pm 2,0
Nr. 4	132,3 \pm 5,2	133,0 \pm 6,0	123,0 \pm 3,1	95,0 \pm 3,2
Nr. 5	130,0 \pm 2,6	134,0 \pm 1,4	120,3 \pm 3,6	93,3 \pm 1,5

3 lentelė Liofilizuotų *L. fermentum* kiekio tyrimo rezultatai

Terpės	Bakterijų kiekis, $\times 10^9$ KSV/ml			
	Centrifugavimo būdas		Nupylimo būdas	
	18 val. amžius	48 val. amžius	18 val. amžius	48 val. amžius
Nr. 1	64,3 \pm 2,9	60,0 \pm 6,7	60,0 \pm 11,0	39,3 \pm 2,7
Nr. 2	85,3 \pm 2,9	57,2 \pm 2,9	81,0 \pm 14,7	42,3 \pm 1,8
Nr. 3	105,0 \pm 9,4	48,2 \pm 3,2	68,0 \pm 2,4	36,7 \pm 2,2
Nr. 4	95,3 \pm 4,0	71,3 \pm 4,7	86,7 \pm 4,3	49,0 \pm 2,5
Nr. 5	97,3 \pm 2,2	84,3 \pm 2,9	84,0 \pm 5,7	31,7 \pm 5,4



1 pav. 18 ir 48 val. amžiaus liofilizuotų laktobacilų gyvybingumas koncentravus centrifugavimo būdu

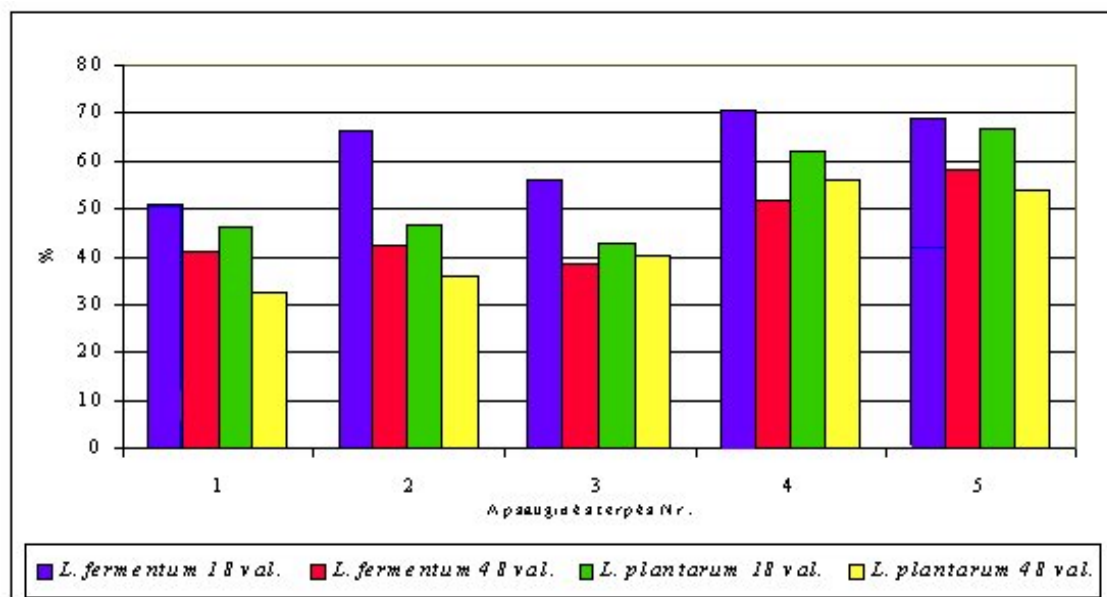
Po liofilizacijos 18 val. amžiaus *L. plantarum*, koncentruotiems centrifuguojant, apsauginėse terpėse Nr. 1, 3, 4 ir 5 nustatyta atitinkamai 15,5% ($p < 0,01$), 1,9% ($p > 0,1$), 7,6% ($p > 0,1$) ir 9,6% ($p < 0,01$) daugiau gyvybingų mikroorganizmų, nei nuo jų nupylus

kultivavimo terpę. Terpėje Nr. 2 nustatyta 5,1% ($p > 0,1$) daugiau gyvybingų mikroorganizmų nuo jų nupylus kultivavimo terpę (1 ir 2 pav.). 48 val. amžiaus *L. plantarum*, koncentruotiems centrifuguojant, visose apsauginėse terpėse nustatyta atitinkamai 0,6% ($p > 0,1$),

3,1% ($p>0,1$), 2,5% ($p>0,1$); 5% ($p>0,1$) ir 12,8% ($p>0,1$) daugiau gyvybingų mikroorganizmų, nei nuo jų nupylus kultivavimo terpę.

Liofilizuotų 18 val. amžiaus gyvybingų *L. fermentum* mikroorganizmų kiekis terpėje Nr. 1 vidutiniškai buvo 6% ($p>0,1$), terpėje Nr. 2 – 23% ($p<0,01$), terpėje Nr. 3 –

32% ($p<0,01$), terpėje Nr. 4 – 18% ($p<0,01$) ir terpėje Nr. 5 – 12% ($p>0,1$) didesnis nei 48 val. amžiaus kultūros. 18 val. amžiaus *L. plantarum* kiekis terpėje Nr. 1 vidutiniškai buvo 22% ($p>0,1$), terpėje Nr. 2 – 7% ($p>0,1$), terpėje Nr. 3 – 2% ($p>0,1$), terpėje Nr. 4 – 3% ($p>0,1$) ir terpėje Nr. 5 – 11% ($p>0,1$) daugiau nei 48 val. amžiaus kultūros.



2 pav. 18 ir 48 val. amžiaus liofilizuotų laktobacilų gyvybingumas koncentravus nupylimo būdu

4 lentelė. *L. plantarum* kiekio tyrimo rezultatai prieš liofilizuojant

Terpės	Bakterijų kiekis, $\times 10^9$ KSV/ml			
	Centrifugavimo būdas		Nupylimo būdas	
	18 val. amžius	48 val. amžius	18 val. amžius	48 val. amžius
Nr. 1	172,0 \pm 5,3	167,0 \pm 2,5	153,3 \pm 4,3	151,3 \pm 2,3
Nr. 2	165,0 \pm 3,1	170,0 \pm 4,2	149,3 \pm 7,2	154,7 \pm 5,0
Nr. 3	167,7 \pm 3,3	166,0 \pm 4,2	154,3 \pm 5,9	151,3 \pm 3,3
Nr. 4	162,0 \pm 7,9	165,3 \pm 1,6	149,3 \pm 2,9	150,0 \pm 4,2
Nr. 5	170,3 \pm 7,1	168,3 \pm 5,4	156,3 \pm 3,3	147,0 \pm 8,2

5 lentelė. Liofilizuotų *L. plantarum* kiekio tyrimo rezultatai

Terpės	Bakterijų kiekis, $\times 10^9$ KSV/ml			
	Centrifugavimo būdas		Nupylimo būdas	
	18 val. amžius	48 val. amžius	18 val. amžius	48 val. amžius
Nr. 1	106,6 \pm 4,3	55,2 \pm 2,5	71,2 \pm 3,3	49,2 \pm 9,4
Nr. 2	68,7 \pm 7,3	66,4 \pm 3,7	69,7 \pm 7,8	55,7 \pm 1,8
Nr. 3	74,7 \pm 4,6	71,0 \pm 4,4	65,8 \pm 14,2	61,0 \pm 4,2
Nr. 4	112,7 \pm 10,0	100,7 \pm 6,1	92,4 \pm 1,9	83,9 \pm 10,3
Nr. 5	130,0 \pm 6,5	112,0 \pm 6,0	104,6 \pm 1,6	92,7 \pm 4,6

Tiriant apsauginių terpių įtaką liofilizuotų mikroorganizmų gyvybingumui, 18 ir 48 val. amžiaus gyvybingų *L. fermentum* ir *L. plantarum* mikroorganizmų nustatyta naudojant terpę Nr. 5 buvo 18% ($p<0,05$) – 35% ($p<0,01$) daugiau nei terpėse Nr. 1, 2, 3 ir 4. Kitos terpės mikroorganizmų gyvybingumui patikimos įtakos neturėjo ($p>0,5$).

Aptarimas ir išvados. Dauguma liofilizuotų pienarūgščių bakterijų išsaugo gyvybingumą ir pagrindines savybes. Mikroorganizmus nuo nepalankių veiksnių padeda apsaugoti apsauginėse terpėse esantys komponentai, taip pat ir tinkamai paruošti mikroorganizmai. Pienarūgščių bakterijų, naudojamų duonos pramonėje, gyvybingumas siekia 63 – 72%.

Sudarius mikroorganizmams optimalias sąlygas, jų gali išlikti 90% (Асонов и др. 1998; Баникова, 1982; Субботин, Сидоров, 1998).

Kultivuojant mikroorganizmus MRS sultinyje, *L. plantarum* kultūros išėiga buvo didesnė nei *L. fermentum*, kuri kultivavimo terpėms jautresnė (Баникова, 1982; Егоров, 1989). Mikrobiologijoje mikroorganizmai dažnai koncentruojami centrifuguojant. Nupylus nuo mikroorganizmų kultivavimo terpę, tam tikra jos dalis lieka, todėl gaunama 9 – 30% mažesnė mikroorganizmų koncentracija. Iš tyrimų rezultatų matome, kad liofilizuojant centrifuguotą kultūrą daugeliu atveju nustatyta daugiau gyvybingų mikroorganizmų. Manome, kad kultūrose, kurios prieš spėdavimą apsauginėmis terpėmis buvo centrifuguotos, galėjo žūti silpni ir pažeisti mikroorganizmai. Tuo tarpu nupylant apsauginę terpę, mikroorganizmai neigiamai nebuvo paveikti. Palyginus mikroorganizmų koncentravimo būdus, patikimo skirtumo tarp gautų gyvybingumo rodiklių nenustatyta.

L.A.Banikova teigia (1982), kad mikroorganizmų amžius jų gyvybingumui didelės įtakos neturi. Tačiau nustatyta, kad po liofilizacijos 48 val. amžiaus gyvybingų *L. fermentum* mikroorganizmų buvo nuo 6% iki 32% mažiau ($p < 0,01$), *L. plantarum* – nuo 7% iki 22% mažiau ($p > 0,1$) nei 18 val. amžiaus kultūrų. Daugelis mokslininkų (Campagne, 2001; Егоров, 1989; Звягин и др., 1981; Лапинскайте, Бабонос, 2003; Никитин, 1971; Овод, 2003) nurodo, kad geriausiai ilgalaikiam saugojimui naudoti stacionarinės augimo fazės mikroorganizmus (18 – 24val.). Labai jaunuose mikroorganizmuose vyksta intensyvūs metaboliniai procesai, pasireiškiantys citoplazminės masės didėjimu, fermentų sistemos aktyvacija. Seni mikroorganizmai taip pat yra jautrūs nepalankiems aplinkos veiksniams.

Mikroorganizmus suspendavus tinkamos sudėties apsaugine terpė, rasta daugiau gyvybingų mikroorganizmų. Po liofilizacijos *L. fermentum* ir *L. plantarum* 18 val. ir 48 val. amžiaus mikroorganizmų padermės apsauginėje terpėje Nr. 5 visais tirtais atvejais buvo 10 – 20% gyvybingesni nei kitose terpėse. Tuo tarpu terpės Nr. 1, 2, 3 ir 4 geru apsauginiu poveikiu nepasižymėjo.

Išanalizavę gautus rezultatus matome, kad liofilizacijos eigoje norint išsaugoti daugiau gyvybingų mikroorganizmų, būtina atsižvelgti į mikroorganizmų amžių ir apsauginės terpės sudėtį.

Išvados:

1. *L. fermentum* gyvybingumas priklausė nuo kultūros amžiaus: po liofilizacijos visose tirtose terpėse gyvybingų 18 val. amžiaus *L. fermentum* mikroorganizmų buvo 6 – 32% daugiau nei 48 val. mikroorganizmų. *L. plantarum* mikroorganizmų amžius įtakos gyvybingumui neturėjo.

2. Koncentravimo būdas įtakos *L. fermentum* ir *L. plantarum* mikroorganizmų gyvybingumui neturėjo.

3. Liofilizuotų mikroorganizmų gyvybingumas priklausė nuo apsauginių terpių sudėties: terpėje Nr. 5 gyvybingų mikroorganizmų išliko 18 – 35% daugiau nei terpėse Nr. 1, 2, 3 ir 4.

Literatūra

1. Bakutis B., Rutkoviėnė V. Ekologinė gyvulininkystė. Reikalavimai ir rekomendacijos, Kaunas, 2000. 12 p.
2. 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. N. 3. P. 1 – 7.
3. 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.
4. Juozaitienė V., Kerzienė S. Biometrija ir kompiuterinė duomenų analizė. Kaunas, 2001. 114 p.
5. Klaenhammer T. Probiotic Bacteria: Today and Tomorrow. Journal of Nutrition. 2000. Vol. 130. N.2. P. 415 – 416.
6. Sederevičius A., Kantautaitė J., Sutkevičienė R. ir kt. *L. plantarum* U-14, *L. fermentum* U-5 padermių ir jų mišinio pH, titruojamojo rūgštingumo ir gyvybingumo kitimas. Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija, 2001. T.14 (36). 52 – 57 p.
7. Trišić-Milanovic N., Rordzić 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.
8. Асонов Н. П. Микробиология. М., Колос. 2001. С. 351.
9. Банникова Л. А. Управление процессами культивирования микроорганизмов заквасок и кисломолочных продуктов. М., 1982. С. 127.
10. Данилевская Н. В., Субботин В. В., Вашурин О. А. Лактобификол для стимуляции продуктивности дойных коров. Ветеринария. 2003. №2. С. 50 – 54.
11. Егоров Н. С. Промышленная микробиология. Москва: Высшая школа. 1989. С. 154 – 156.
12. Лапинскайте Р., Бабонос И. Эффективность применения симбионтного зуботина STF. Ветеринария. 2003. №3. С. 22 – 26.
13. Малик Н. И., Панин А. Н. Ветеринарные пробиотические препараты. Ветеринария. 2001. №1. С. 46 – 48.
14. Несчисляев 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 – 28.
15. Несчисляев В. А. Пробиотики: Ретроспектива, проблемы и достижение научно производственной практики. Ж. микроб. эпид. иммунол. НПО <Биомед> 1998. №2. С. 100 – 102.
16. Никитин Е. Е. Замораживание и высушивание биологических препаратов. Москва: Колос. 1971. 197с.
17. Овод А. С. Направленное формирование бактериоцианоза кишечника. Ветеринария. 2003. №2. С. 23 – 36.
18. Поздеев О. К., Покровский В. И. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР Медицина. 1999. С. 76. – 80.
19. Сорокулова И. Б., Белявская В. А., Масычева В. И. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования для медицины и ветеринарии. Вестн. РАМН. 1997. №3. С. 46 – 49.
20. Субботин В. В., Сидоров М. А. Биотехнология пробиотиков ветеринарного назначения. Аграр. наука. 1998. №3. С. 20 – 21.
21. Звягин И. В., Хорьков И. А., Токарин Э. Ф. и др. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания биологических препаратов. М. 1981. С. 33.