

ВПЛИВ ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ НА ДОВГОТРИВАЛЕ ЗБЕРІГАННЯ ЗАКВАШУВАЛЬНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ЛРР

Досліджено рівень життєздатності заквашувальної композиції ЛРР після тривалого зберігання у ліофілізованому стані. Встановлено, що 7-річне зберігання композиції у ліофільновисушеному стані за низьких температур призвело до незначного зменшення активності кожного із компоненту композиції. Встановлено, що для максимального зберігання активних клітин заквашувальної композиції ЛРР необхідно застосовувати такі кріопротектори, як сухе знежирене молоко, цитрат натрію, сахарозу та желатин. Доведено правильний підбір компонентів захисних середовищ, які забезпечують високий ступінь життєздатності мікроорганізмів упродовж заморожування, сушіння.

Ключові слова: мікроорганізми, збереження життєздатності, кріопротектор, захисні середовища, заморожування, сушіння.

Ts.O. Korol, Ph.D.Technics, sen.res.worker
Food Resources Institute of NAAS

EFFECT OF A PROTECTIVE MEDIUM FOR LONG-TERM STORAGE OF STARTER COMPOSITION LRR

The level of cell viability of starter composition LRR after long-term storage in a lyophilized state has been studied. It is found that the 7-year storage of composition after freeze-drying at low temperatures resulted in a slight decrease in the activity of each of the composition components. It was found that for maximum preservation of active cells starter of LRR composition such cryoprotectants as dry nonfat milk, sodium citrate, sucrose and gelatin should be used. It was proved the correct selection a protective medium of components resulted high degree of viability of microorganisms during freezing, drying.

Key words: microorganisms, viability saving, cryoprotectant, protecting the medium, freezing, lyophilization.

Ц.А. Король, к.т.н., с.н.с.
Інститут продовольственных ресурсов НААН

ВЛИЯНИЕ ЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ НА ДОЛГОВРЕМЕННОЕ ХРАНЕНИЕ ЗАКВАСОЧНОЙ КОМПОЗИЦИИ ЛРР

Исследован уровень жизнеспособности заквасочной композиции ЛРР после длительного хранения в лиофилизированном состоянии. Установлено, что 7-летнее хранение композиции в лиофильновисушеном состоянии при низких температурах привело к незначительному уменьшению активности каждого из компонентов композиции. Установлено, что для максимального сохранения активных клеток заквасочной композиции ЛРР необходимо применять такие кріопротекторы как сухое обезжиренное молоко, цитрат натрия, сахарозу и желатин. Доказано правильный подбор компонентов защитных сред, обеспечивающих высокую степень жизнеспособности микроорганизмов в течение замораживания, сушки.

Ключевые слова: микроорганизмы, сохранение жизнеспособности, криопротектор, защитные среды, замораживание, сушка.

Для консервування біомаси бактеріальних препаратів застосовують різні способи, серед яких найпоширенішими є заморожування та сушіння. Сушіння в промислових умовах проводять контактним, розпилювальним та сублимаційним способами [1-3]. Для заквашувальних препаратів найсприятливішим є сублимаційне сушіння, яке за правильного добору захисного середовища і ретельного дотримання режимів сушіння дозволяє зберегти від 30 % до 100 % життєздатних клітин упродовж тривалого часу [4, 5]. Життєздатність та стійкість мікроорганізмів при заморожуванні залежить від багатьох чинників. Зокрема, від стану клітин і їхньої концентрації, а також видової приналежності до того чи іншого виду мікроорганізмів, складу захисного середовища, режимів охолодження.

З метою зниження до мінімуму пошкоджень клітин мікроорганізмів за сублимаційного сушіння застосовують криопротектори, які входять до складу захисних середовищ (ЗС), і здатні зменшити негативний вплив температурного і осмотичного шоку та забезпечити певний рівень життєздатних клітин у сухому препараті [6, 7].

Механізм захисної дії криопротекторів заснований, головним чином, на їх здатності створювати міцніші зв'язки з молекулами води, ніж зв'язок молекул води між собою, що перешкоджає формуванню правильної кристалічної решітки льоду і затримує початок росту кристалів. При розробленні захисних середовищ для виробництва бактеріальних препаратів, які використовуються в харчовій промисловості, до складу повинні залучатися криопротектори, які мають статус харчових.

Слід зауважити, що жодне відоме захисне середовище не є універсальним, тому для кожного виду бактеріального препарату його підбирають емпіричним шляхом [8, 9]. За компонентами, що залучаються до захисних середовищ, останні поділяють на три групи: колоїдні середовища тваринного, рослинного чи мінерального походження; середовища з розчинними сполуками, такими як вуглеводи, продукти гідролізу білків (пептони, дріжджовий екстракт, амінокислоти); а також середовища, в яких поєднані колоїди з розчинними сполуками. Найчастіше використовують комбіновані захисні середовища, до складу яких залучають цукрозу, лактозу, декстрин, манозу, фруктозу, крохмаль, желатин, гліцерин, сусло, буферні солі, знежирене та гідролізоване молоко, суху сироватку, цитрат, глутамат натрію, казеїнат натрію, лізин, апілак, бульйон, пептон, колаген, екстракт солоду, поліетиленгліколь, полівінілпірролідон тощо [7, 8, 10].

Ступінь виживання мікроорганізмів залежить від складу та кількості криопротекторів. Для кращого виживання бактерій доцільно використовувати захисні середовища з підвищеною часткою сухих речовин. Було встановлено, що за умови застосування концентрованих ЗС з масовою часткою сухих речовин (18-19) % у співвідношенні (3-5):1 до сирової біомаси, відповідно, а також додавання криопротектору від 0,8 до 60,0 % до біомаси гарантують виживання (97-99) % клітин мікроорганізмів під час ліофілізації та зберігання сухого препарату [10-12].

Для збереження заквашувальних культур молочнокислих бактерій після сублимаційного сушіння і наступного зберігання застосовували нову комбінацію криопротекторів, до складу якої входять гідролізат крохмалю і сіль глютамінової кислоти і / або поліол [13].

У разі застосування захисного середовища на основі фосфатного буферу з рН 7,2 з додаванням суміші гліцерину (15-20)%, цитрату натрію (1-10)%, лактози (10-40)%, желатину (1-10)% та змішування з біомасою у співвідношенні 1:1 вдалося зберегти лактобактерії на рівні $3,0\text{-}5,0 \cdot 10^{11}$ КУО/см³ [14].

Чимало захисних середовищ розроблено на основі сироватки чи гідролізованого молока. Для збереження заквашувальної культури природного штаму молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis ssp. lactis* ВКПМ В-8558 застосовують таке захисне середовище:

знежирене молоко з підвищеною масовою часткою сухих речовин (до 15%) або знежирене молоко змішане з желатином в однаковому співвідношенні [15]. Високий ступінь захисту молочнокислих лактококів і лейконостоків показало захисне середовище, на основі гідролізованого молока з додаванням цукру – 10%; амонію лимоннокислого – 2%; кислоти аскорбінової – 0,5 %; магнію сірчанонокислого - 0,05% ; апілаку - 0,07%, і яке змішували з біомасою у співвідношенні 1:1 – 2:1 [16].

Вплив п'яти кріопротекторів (цукрози, лактози, глутамату натрію, пептону, сухого знежиреного молока), як окремо, так і в комбінаціях з желатином, глютаміновою кислотою та оцтовокислим натрієм на життєздатність мікрококів *M. varians* M₉₅ та лактобактерій *L. plantarum* L₄ за сублімаційного сушіння було досліджено болгарськими вченими. Найкращі результати було отримано зі ЗС, які містили сухе знежирене молоко та пептон у кількості 8 % та 5 %, відповідно. Активність культур залишалась високою як після заморожування, так і після сублімаційного сушіння [17].

Процес розробки біотехнології кожної нової заквашувальної культури неодмінно передбачає добір відповідного захисного середовища і співвідношення між його об'ємом і кількістю одержаної маси.

Таким чином, якість отриманого бактеріального препарату формується на всіх стадіях технологічного процесу, тому детальне опрацювання кожної з них конче необхідно.

Метою даної роботи було дослідження впливу різних захисних середовищ на життєздатність культур заквашувальної композиції “ЛРР” після ліофільного сушіння та упродовж довготривалого зберігання.

Об'єкти і методи дослідження. Об'єктом досліджень була заквашувальна композиція “ЛРР” створена для виробництва ферментованих суцільном'язевих виробів із м'яса птиці. До складу цієї композиції входять культури видів *Lactobacillus rhamnosus* та *Kocuria rosea* [18].

Під час роботи було застосовано наступні захисні середовища: 1) сухе знежирене молоко (СЗМ), сахароза, цитрат натрію, сульфат магнію; 2) СЗМ, фосфатний буфер рН 6,86, маніт; 3) сахароза, желатин; 4) СЗМ, цитрат натрію, сахароза; 5) цитрат натрію, сахароза, гліцерин; 6) цитрат натрію, сахароза, желатин, глутамат натрію. Контроль (К) — заквашувальна композиція без ЗС. Штами перевірялись на чистоту фарбуванням за Грамом [19].

Спосіб приготування заквашувальної композиції: інокуляти молочнокислих бактерій вирощували на середовищі МРС упродовж (22±2) год. за температури (32±2) °С; інокулят мікрококу вирощували на поверхні м'ясо-пептонного агару (МПА) у матрацах площиною близько 800 см² (бутилях типу РУ) упродовж 46-48 год. Потім інокулят мікрококу змивали з матрацу, додавали до інокуляту молочнокислих бактерій і отримували культуральну рідину композиції в певному співвідношенні. Її змішували з різними варіантами стерилізованих захисних середовищ у співвідношенні 1:2. Одержану суспензію бактеріальних клітин заморожували за температури мінус (40±2)°С і сушили за відповідних режимів в сублімаційній сушарці.

Якість ліофолізованих заквашувальних композицій оцінювали за показниками виживання їх компонентів за різницею до і після ліофілізації та упродовж подальшого зберігання. Активність композиції визначали за вмістом чисельності визначених видів мікроорганізмів в 1 г: кількість молочнокислих бактерій за ГОСТ 10444.11-89 та кількість життєздатних клітин мікрококу шляхом висіву відповідних серійних розведень в стерильному фізіологічному розчині на м'ясо-пептонний агар з 5 % NaCl [20].

Культури підтримувались за однакових умов за температури мінус (18±2) °С упродовж семи років.

Результати та обговорення. Створена заквашувальна композиція містила мікроорганізми двох таксономічних груп (два штами *Lactobacillus rhamnosus* та один штамп *Kocuria rosea*) з різною стійкістю до режимів ліофілізації. Відомо, що мікрококи більш стійкішими до ліофілізації, ніж лактобактерії [21]. Тому під час опрацювання режимів сушіння особливу увагу звертали на збереження чисельності та активності лактобактерій.

Було встановлено, що дослідні шість захисних середовищ по-різному впливали на життєздатність бактеріальної маси упродовж 15 місяців (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив захисних середовищ на життєздатність заквашувальної композиції “ЛРР” зразу після ліофільного сушіння

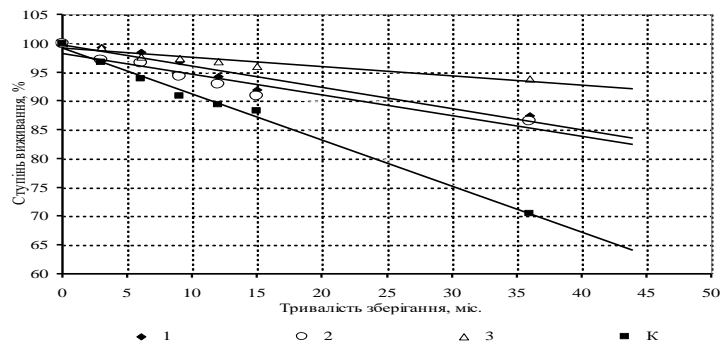
№ захисного середовища	Ступінь виживання, %		
	МКБ	МК	Загальний
ЗС 1	84,8	95,2	90,0
ЗС 2	88,4	95,2	91,8
ЗС 3	97,9	96,8	97,4
ЗС 4	98,3	94,4	96,3
ЗС 5	90,0	84,4	87,2
ЗС 6	95,2	96,8	96,0
К	85,5	89,4	87,5

Примітка. Наведено середні значення; $n=4$, $P \leq 0,05$. К – композиція без ЗС.

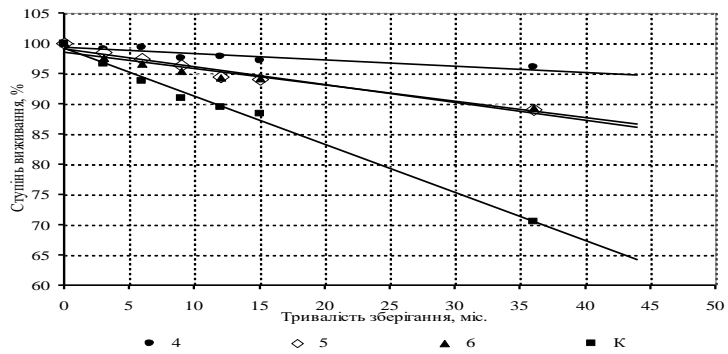
Молочнокислі бактерії композиції “ЛРР” під час заморожування та сублимаційного сушіння втрачали (2,1-15,2) % життєздатних клітин. За тих же умов кількість мікрококів у композиціях “ЛРР” зменшувалась на (3,2–15,6)%. Найвища захисна дія була притаманна середовищам № 3, № 4 та № 6, які забезпечували найвищий рівень виживання: для молочнокислих бактерій 10^8 КУО/см³ та мікрококу – близько 10^7 КУО/см³.

Зберігання вище описаних заквашувальних композицій здійснювали за відносної вологості повітря 80 % та температури мінус (18 ± 2) °С (рис. 1).

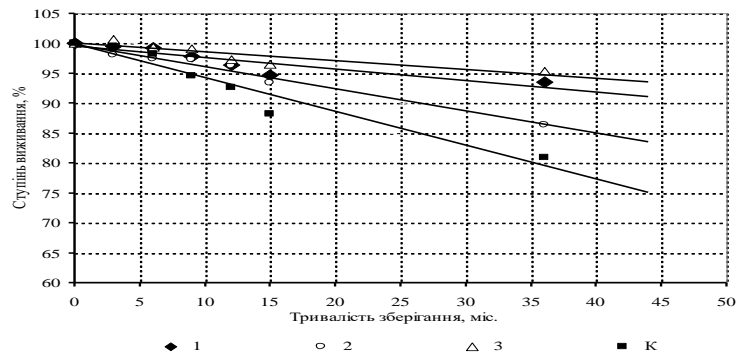
Упродовж перших 9 місяців зберігання ступінь виживання як молочнокислих бактерій, так і мікрококів була у межах від 89,3 % до 99,5 %, і швидкість відмирання клітин коливалася у діапазоні від 0,01 до 0,08 год⁻¹. Лактобактерії композицій № 1-6 за 9 місяців відмирили на 4,8-8,2 % повільніше порівняно з контрольним варіантом, про що свідчать відповідні значення у дослідних варіантах $\mu_{\text{відм}} = 0,01-0,03$ год⁻¹ та контролі - 0,08 год⁻¹. Також встановлено, що мікрококи впродовж цього терміну були стійкішими до зберігання, ніж молочнокислі бактерії. Вони втрачали свою активність у цих варіантах та контролі на 1,5-2,2 % повільніше ніж лактобактерії. Загалом, за 9 місяців зберігання у композиціях 1-6 відмирання клітин було незначним, зокрема, чисельність молочнокислих бактерій зменшилась на (2,4-5,7) %, а мікрококів на (0,4-4,2) % від початкової кількості. Окрім композицій 3 та 4, де життєздатність молочнокислих бактерій та мікрококів була на рівні 97,5 % та 99,5 %, відповідно. Упродовж наступних 3 місяців (від 9 до 12 міс.) в усіх композиціях швидкість відмирання клітин молочнокислих бактерій та мікрококів знаходилась в межах від 0,01 до 0,04 год⁻¹ порівняно з контролем (0,08 год⁻¹ та 0,04 год⁻¹) відповідно для МКБ та МК. Упродовж 12 місяців залежно від застосованого ЗС молочнокислі бактерії втрачали 2,2–7,1 % клітин від початкової кількості, тоді як мікрококи – від 0,8 % до 6,5%.



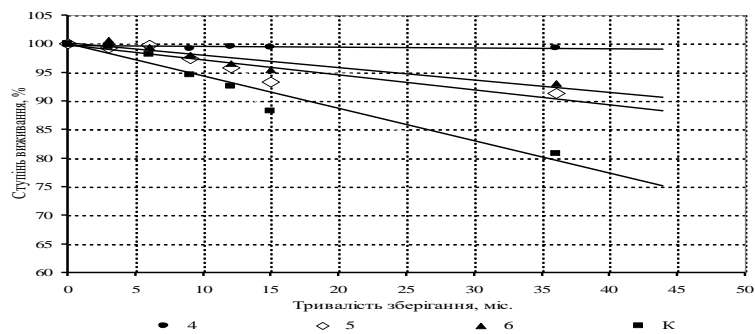
а



б



в



г

Рис. 1 . Вплив захисних середовищ 1-6 на життєздатність молочнокислих бактерій (МКБ) (а, б) та мікрококів (МК) (в, г).

1-6 – композиції з різними захисними середовищами, К – композиція без захисного середовища.

Відомо, що для збереження основних біотехнологічних властивостей концентрат не повинен втратити більше 10 % клітин від початкового вмісту [21]. Таким характеристикам відповідали усі варіанти застосованих середовищ, а найменша втрата припадала середовищам №3 та №4. Ступінь виживання клітин в цих композиціях була найбільшою (96-99) % і швидкість відмирання мікроорганізмів була найменшою: $\mu_{\text{відм}}=(0,01\div 0,02) \text{ год}^{-1}$ упродовж 9-12 місяців зберігання. Подовження терміну зберігання концентратів ще на 3 місяці призводило до подальшого відмирання клітин: для молочнокислих бактерій – втрачалось 2,8-4,0 % клітин та для мікрококів 0,6–2,3 % порівняно з початковим вмістом. Упродовж наступних ще 24 місяці спостерігалась аналогічна тенденція по відмиранню клітин заквашувальної композиції (див. рис. 1).

Отже, встановлено, що оптимальний термін зберігання усіх варіантів концентрату становив 12 місяців.

На основі проведених досліджень зроблено висновок, що ЗС №3-4 характеризуються найвищим захисним ефектом, оскільки вони забезпечували стабільність компонентів композиції, як за ліофілізації, так і за зберігання його упродовж 12 місяців за температури мінус $(18\pm 2) ^\circ\text{C}$. Ці експериментальні дані було взято за основу для розробки технології заквашувального препарату “ЛРР”.

При зберіганні сухої композиції за температури $(8\pm 2) ^\circ\text{C}$ відмирання клітин упродовж перших трьох місяців проходило в межах (5-6) %, а за нижчих температур мінус $(18\pm 2) ^\circ\text{C}$ – (2-4) % для усіх варіантів. Через 6 місяців зберігання за $(8\pm 2) ^\circ\text{C}$ і через 12 місяців за мінус $(18\pm 2) ^\circ\text{C}$ відмирало 7-9 % бактеріальних клітин. Зберігання композиції за температури $(8\pm 2) ^\circ\text{C}$ упродовж 6 місяців не спричинило негативної дії на його властивості, зокрема не спостерігалось випадків контамінації продукту сторонньою мікрофлорою.

Тому для гарантованого зберігання заквашувального препарату ЛРР, що був розроблений на основі досліджуваної композиції, було рекомендовано термін його придатності:

- за температури $(8\pm 2) ^\circ\text{C}$ – не більше 6 місяців із дати виробництва;
- за температури мінус $(18\pm 2) ^\circ\text{C}$ – не більше 12 місяців із дати виробництва.

При дослідженні після зберігання 7-ми років у морозильній камері отримали цікаві результати (рис. 2).



Рис. 2. Рівень життєздатності клітин композиції ЛРР упродовж 7 років зберігання в залежності від застосованого кріопротектору.

МКБ- молочнокислі бактерії, МК – мікрококи.

Молочнокислі бактерії і мікрококи, що входять до складу заквашувальної композиції є ще активними навіть після 7-ми років зберігання. Найбільша кількість життєздатних клітин молочнокислих бактерій та мікрококів збереглася у композиції із захисним середовищем № 3 та 4, що вказує на захисну дію залучених кріопротекторів. У цих композиціях ступінь виживання молочнокислих бактерій була на рівні 90-92%, а мікрококів на рівні 98,0-99,0 %.

При тривалому зберіганні у композиціях №1, №2, №5 та № 6 молочнокислі бактерії втрачали свою активність у межах від 19,0 до 21,0 %, а мікрококи втрачали свою активність повільніше в межах від 7,1% до 17,6 %.

Отже для довготривалого зберігання для композиції найкращими кріопротекторами є сухе знежирене молоко, цитрат натрію, сахароза та желатин. Отримані дані спонукають нас до наступних досліджень щодо оптимізації умов довготривалого зберігання як заквашувальних препаратів, так і монокультур окремих видів мікроорганізмів у колекціях.

Таким чином, проведені дослідження показали, що тривале зберігання у ліофільно-висушеному стані за низьких температур несуттєво впливає на найважливіші технологічні властивості штамів лактобактерій та мікрококів, що дозволяє рекомендувати їх для тривалого застосування.

Висновки

Здійснено підбір компонентів захисних середовищ, які забезпечують високий ступінь життєздатності мікроорганізмів упродовж заморожування, сушіння, а також довготривалого зберігання.

Досліджено стан культури за довготривалого зберігання за низьких температур за технологічними властивостями. Досліджені захисні середовища розрізняються за своєю протекторною дією щодо культур заквашувальної композиції "ЛРР". Встановлено, що впродовж 12 місяців за температури мінус (18±2) °С у композиції № 3 та № 4 із застосуванням сахарози, желатина, сухого знежиреного молока та цитрату натрію максимально зберігаються активні клітини заквашувальної композиції. Для довготривалого зберігання краще застосовувати захисне середовище № 4, яке сприяє високому ступеню виживання як лактобактерій, так і мікрококів.

Проведені експериментальні дослідження показали, що опрацьовані захисні середовища та режими дозволяють зберігати в активному стані кожний із компонентів заквашувальної композиції упродовж 7 років.

Література

1. Кробиология и биотехнология / А.А. Цудаева, В.Г. Попов, К.М. Сытник; Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. – К.: Наукова думка, 1987. - 216 с.
2. Pheighambardoust S.H. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review / S.H. Pheighambardoust, A.Golshan Tafti, J.Hesari // Trends in Food Science & Technology. – 2011. – Vol. 22, №5. – P. 215-224.
3. Патент RU 2187943 С2 МПК А23L1/03, А23С9/123, С12N1/04 Способ распылительной сушки композиции, содержащей микроорганизмы / Н. Майстер (СН), Ю. Эбишер (СН), М. Викас (АТ), К. Эйер (СН), Д. Де Паскуале (US). - заявл. 08.07.1997. - опубл. 27.08.2002.
4. Промышленная микробиология: Учебн. пособие для вузов по спец. "Микробиология" и "Биология" / З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина и др. Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высшая школа, 1989. – 688 с. ISBN 5-06-001482-7.

5. Carvalho A.S. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants / A.S. Carvalho, J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F.X. Malcata, P. Gibbs // *Biotechnology Letters*. – 2002. – Vol. 24, № 19. – P. 1587-1591.
6. Pehkonen K.S. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) / K.S. Pehkonen, Y.H. Roos, S. Miao, R.P. Ross, C. Stanton // *Journal of Applied Microbiology*. – 2008. – Vol. 104, № 6. – P. 1732-1743.
7. Похиленко В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. – 2009. – № 4 (12). – С. 99–121.
8. Пат. RU № 02427624 С1, МПК С12N1/04, С12N1/20. Способ замораживания молочно-кислых бактерий / О.М. Кузьмина (RU), В.Д. Харитонов (RU). - № 2010120515/10; заявл. 24.05.2010, - опубл. 27.06.2011.
9. Белов А.Н. Влияние состава защитных сред при сублимации и хранении концентратов молочнокислых бактерий / А.Н. Белов, Л.П. Белова., Т.Л. Криворотова, Н.М. Гусева // *Молочная промышленность*. – 1993.- №1. – С. 25-26.
10. Пат. RU 2344168 С2 МПК 7 С12N1/04, С12N1/38, А23С19/032, А23С19/068 Применение соединений, участвующих в биосинтезе нуклеиновых кислот в качестве криопротективных агентов / Б.В. Крингелум (DK), Н.М. Соренсен (DK), П. Соренсен (DK). - № 2006102957/13, заявл. 02.07.2004. – опубл. 20.01.2009. Бюл. 2.
11. Романчук И.О. Повышение выживаемости бактериальных культур в процессе производства лиофилизированных препаратов / И.О. Романчук, Г.Ф. Насырова, Н.Ф. Кигель // *Вісник аграрної науки*. – 1999. – № 11. – С. 63-65.
12. Пат. № 33321 А Україна, МКИ С12N1/20. Спосіб одержання сухого бактеріального препарату для ферментованих молочних продуктів / Г.О. Єресько, Г.Ф. Насырова., І.О. Романчук, Н.Ф. Кігель – заявл. 03.10.2000. - опубл. 15.02.2001, Бюл.№1.
13. Пат. AU 2016/201489 А1 МПК С12N1/04. Cryoprotectants for freeze drying of lactic acid bacteria / S. Corveleyn (BE), P. Dhaese (BE), S. Neiryck (BE), L. Steidler (BE). - № 2010243906; заявл. 08.03.2016; опубл. 24.03.2016. - 37 с.
14. Патент RU №2475527 С1 МПК С12N1/04, С12N1/20, С12R1/225 Способ консервирования молочнокислых бактерий *Lactobacillus delbrueckii* / В.В. Евелева, Н.В. Каменькова, И.Д. Никулина, Т.М. Черпалова - № 2011129519/10; заявл. 15.07.2011. - опубл. 20.02.2013, Бюл. № 5.
15. Пат. RU 2295563 С1 МПК 7 С12N001/20, А23С009/123, С12Р019/04, С12R001/46 Штамм бактерий *Lactococcus lactis subspecies lactis* ВКПМ В-8558, используемый в производстве молочных продуктов, и способ получения стартерной культуры штамма *Lactococcus lactis subspecies lactis* ВКПМ В-8558/Т.В. Рожкова (RU), В.И. Ганина (RU). - № 2005125605/13, заявл. 12.08.2005. – опубл. 20.03.2007.
16. Патент RU № 2157640 С1 МПК А23С19/032, С12N1/20 Способ получения концентрата молочнокислых бактерий для производства сыров / Н.П.Сорокина, Н.В. Суслов, Г.Д. Перфильев, Р.М. Мурашова (RU). - № 98117372/13, заявл. 15.09.1998. – опубл. 20.10.2000.
17. Tsvetkov Ts. Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants / Ts. Tsvetkov, R. Brankova // *Cryobiology*. – 1983. – Vol. 20, № 3. – P. 318-323.

18. ТУ У 15.5-00419880-101:2010. Препарати бактеріальні для ферментованих м'ясних продуктів. Технічні умови.
19. ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання [Текст]. - Чинний від 2014-01-01. - Київ: Мінекономрозвитку України, 2014. - III, 35 с.: табл. - (Національний стандарт України).
20. ГОСТ 10444.11-1989. Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов [Текст]. — Введ. 1991-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1989. – 13 с.
21. Tsvetkov Ts. The viability of *Micrococcus varians* and *Lactobacillus plantarum* in freezing and freeze drying in the presence of various cryoprotectors / Ts. Tsvetkov, R. Brankova, Ya. Yankov, G. Raikov // Cryobiology. – 1980. – Vol. 17, № 6. – P. 599.