

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỐNG SÓT VÀ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA NẤM MEN BÁNH MÌ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VÀ *ACETOBACTER XYLINUM* KHI BẢO QUẢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÔNG KHÔ

VIABILITY AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF BAKER'S YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND *ACETOBACTER XYLINUM* WHEN PRESERVED BY LYOPHILIZATION

Trần Thị Xô¹, Ngô Thị Minh Phương²

¹Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

²Trường Cao đẳng Công nghệ, Đại học Đà Nẵng

Tóm tắt - Đông khô là một phương pháp bảo quản phổ biến trong việc lưu giữ bộ sưu tập các chủng vi sinh vật. Phương pháp này rất tiện lợi cho việc bảo quản và vận chuyển cũng như giữ cho các vi sinh vật sống sót trong thời gian dài. Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số điều kiện để cải thiện phương pháp đông khô trên chủng nấm men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* và vi khuẩn lên men tạo cellulose *Acetobacter xylinum*. Trong quá trình bảo quản, định kì kiểm tra khả năng sống sót và đặc tính sinh học của chúng và kết quả cho thấy rằng: Sau khi đông khô, tỉ lệ sống sót của vi khuẩn là 12%, của nấm men là 2,96%, sau thời gian bảo quản 2 năm tỉ lệ sống sót của vi khuẩn vẫn còn ở mức cao 3*10⁶CFU/ml và của nấm men là 106CFU/ml. Đặc tính sinh học của hai chủng này có giảm nhưng không đáng kể. Chất bảo vệ có hiệu quả nhất trong quá trình đông khô là sữa gầy.

Từ khóa - *Saccharomyces cerevisiae*; *Acetobacter xylinum*; chất bảo vệ; sống sót.

Abstract - Freeze-drying is a common method of preservation in the storage collection of microorganisms. This method is very convenient for storage and transport and it helps the microorganisms survive in the long-term period. In this paper, we studied some conditions to improve the method of freeze-dried on yeast's baker *Saccharomyces cerevisiae* and bacteria fermented cellulose *Acetobacter xylinum*. During storage, evaluating viability and their biological properties, the results showed that after freeze-drying, the survival rate of bacteria is 12 %, yeast is 2,96 %, after 2 years of storage, the survival of bacteria remained at high rate 3*10⁶CFU/ml and yeast is 106CFU/ml. Biological characteristics of two strains have decreased but not at a considerable rate. The most efficient protectant of freeze-drying is skim milk.

Key words - lyophilization; *Saccharomyces cerevisiae*; *Acetobacter xylinum*; cryoprotectants; survival.

1. Đặt vấn đề:

Chủng nấm men *S.cerevisiae* là tác nhân quan trọng để làm nở bột nhào trong sản xuất bánh mì. Vi khuẩn *A.xylinum* có khả năng lên men tạo cellulose được lựa chọn cho quá trình lên men sản phẩm thạch dừa. Chúng tôi chọn hai chủng này để nghiên cứu vì chúng có ý nghĩa lớn và tầm quan trọng trong công nghệ thực phẩm - sinh học. Nếu bảo quản chủng giống này bằng những phương pháp thông thường thì thời gian bảo quản rất ngắn, giống dễ bị thoái hóa theo thời gian, vì vậy việc tìm ra một phương pháp bảo quản tốt là việc hết sức cần thiết.

Đông khô là một quá trình được sử dụng rộng rãi để bảo quản và lưu giữ lâu dài các bộ sưu tập vi sinh vật. Nhiều chủng vi sinh vật đông khô được gửi đến bộ lưu giữ vi sinh vật sáng chế quốc tế (IPOD) và được kiểm tra định kì đến 20 năm. Vi sinh vật được lưu giữ bằng phương pháp đông khô có nhiều ưu điểm: khả năng sống sót cao, rất tiện cho việc sử dụng và lưu chuyển. Tuy nhiên trong quá trình đông khô các tế bào phải chịu những điều kiện rất khắc nghiệt như nhiệt độ và hoạt độ nước thấp làm ảnh hưởng cấu trúc và sinh lý của tế bào, kết quả làm mất khả năng sống sót của chúng. Để ngăn chặn hoặc giảm thiểu các tác động không mong muốn này, người ta phải thêm vào các chất bảo vệ trước khi lạnh đông [6]. Với những lí do trên, mục đích nghiên cứu của chúng tôi là đánh giá khả năng sống sót và đặc tính sinh học của hai chủng *S.cerevisiae* và *A.xylinum* với những chất bảo vệ khác nhau trong thời gian bảo quản 2 năm và tìm ra chất bảo vệ thích hợp nhất cho quá trình đông khô trên hai chủng nghiên cứu.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Vi khuẩn *A.xylinum* được hoạt hóa lại từ mẫu giống ở viện Công nghệ sinh học TP. HCM, nấm men bánh mì *S.cerevisiae* phân lập từ bánh men ướt để sản xuất bánh mì.

- Môi trường HS và PDA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp vi sinh

Xác định gián tiếp số lượng tế bào bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch

Số lượng tế bào vi sinh vật trong 1ml mẫu được tính theo công thức sau:

$$\text{Số tế bào/ml mẫu} = \frac{n.D}{V}$$

Trong đó:

n: Số khuẩn lạc trung bình trong một đĩa Petri ở một độ pha loãng nhất định.

V: Thể tích dịch mẫu đem cấy (bằng 0,1ml đối với phương pháp cấy gọt và 1ml đối với phương pháp đổ đĩa)

D: hệ số pha loãng

2.2.2. Phương pháp vật lí

a. Đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật

Tiến hành đo độ đục trên máy UV-Vis ở bước sóng 600nm trong quá trình xác định khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm men *S.cerevisiae* và vi khuẩn *A. xylinum*.

Số lượng tế bào biểu kiến/ml có thể được tính thông qua mật độ quang học OD bằng phương trình sau:

$$\frac{2,5 \times 10^8 \text{ cells/ml}}{0,3} = \frac{X}{\text{OD}}$$

Trong đó:

X: số lượng tế bào/ml

OD: giá trị mật độ quang học đo ở bước sóng 600nm [7]

b. Xác định hoạt lực làm nở của nấm men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* [1]

- Chuẩn bị bột mì nhào trộn với 1% nấm men dạng paste. Cho khối bột nhào (khoảng 50g) vào cốc 100ml có chia vạch ml. Đọc chính xác thể tích lúc này và sau 30 phút tiến hành đo thể tích khối bột nhào một lần.

c. Xác định khả năng tạo khối đông thạch dừa của *Acetobacter xylinum*

Lấy 10ml nước dừa già, bổ sung 1g đường saccarose, 0,05g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,08ml axit acetic 40% bằng. Dùng axit acetic 40% này để điều chỉnh pH môi trường đến pH = 5. Thanh trùng môi trường bằng cách đun sôi nhẹ trong thời gian 15 – 20 phút. Để nguội và cấy vi khuẩn *Acetobacter xylinum* vào với tỉ lệ giống 10%, để lên men ở nhiệt độ 30°C và giữ trong 8 ngày. Sau đó vớt và cân để biết khối lượng thạch dừa lên men được.

2.2.3. Phương pháp đông khô

Nuôi vi sinh vật trên các môi trường thích hợp cho đến cuối giai đoạn logarit, thu tế bào và trộn các chất bảo vệ như Bảng 1, dùng pipet vô trùng phân từng 0,2ml huyền phù vi sinh vật vào các ống đông khô chuyên dùng. Sau đó tiến hành đông khô mẫu [4].

Chuẩn bị mẫu đông khô như sau: Nấm men và vi khuẩn được điều chỉnh để có mật độ chính xác được số lượng tế bào/ml ban đầu. Sau đó cho dịch huyền phù tế bào được trộn với dịch bảo vệ đã được thanh trùng theo tỉ lệ 1:1, cho vào mỗi ống nghiệm kích thước Ø45mm 0,2ml dung dịch mẫu và sau đó được làm lạnh sâu ở -20°C. Sau đó mẫu được đưa vào đông khô ở 40°C trong 8 giờ. Sau khi đông khô, mẫu được hàn kín bởi parafin và bảo quản ở 4°C.

Bảng 1. Dung dịch và nồng độ các chất bảo vệ khi đông khô

Chất bảo vệ	Nồng độ, %
Saccarose + cao nấm men	10 + 0,75
Saccarose + pepton	10 + 0,5
Sữa gầy	10
Tinh bột	30

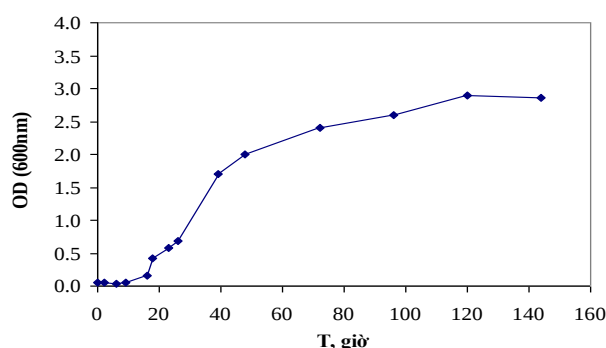
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Sự phát triển và đặc tính sinh học ban đầu của nấm men bánh mì *S.cerevisiae*, vi khuẩn *A.xylinum*

3.1.1. Khả năng sinh trưởng và phát triển của hai chủng vi sinh vật nghiên cứu

Để xác định khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn *Acetobacter xylinum*, chúng tôi tiến hành nuôi cấy giống vi khuẩn *Acetobacter xylinum* trong môi trường HS với tỉ lệ giống là 10%. Các mẻ cấy vi khuẩn này được nuôi ở 30°C trong 6 ngày. Cứ sau 6 giờ chúng tôi lấy mẫu đo OD_{600nm} trên máy UV-Vis và thu được kết quả như ở đồ thị Hình 1.

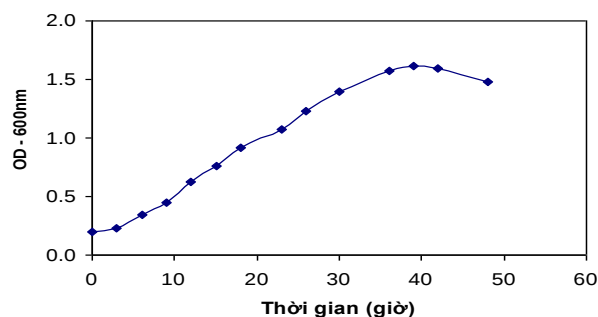
Nhận xét: Qua đồ thị Hình1 ta thấy rằng: Lượng sinh khối đạt được cao nhất sau 120 giờ nuôi cấy và chỉ số OD_{max} = 2,89.



Hình1. Đồ thị biểu diễn sự sinh trưởng và phát triển của *A.xylinum*

Như vậy khi lấy mẫu đi bảo quản, chúng tôi sẽ lấy mẫu sau khi bắt đầu nuôi cấy 72 giờ vì ở thời điểm đó, tế bào vi khuẩn đang trong giai đoạn phát triển với tốc độ cao, tế bào còn non trẻ phù hợp để mang đi bảo quản.

Khả năng sinh trưởng và phát triển của *S.cerevisiae* được biểu diễn ở đồ thị Hình2.



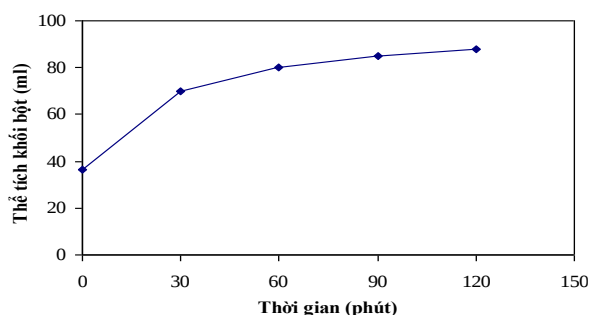
Hình2. Đồ thị biểu diễn sự sinh trưởng và phát triển của nấm men bánh mì

Nhận xét: Qua đồ thị Hình2 ta nhận thấy: Tốc độ sinh trưởng và phát triển của nấm men đạt cực đại sau 39 giờ, giá trị OD_{max} = 1,612. Ta chọn được thời điểm thích hợp để lấy mẫu đem bảo quản là trước 39 giờ.

3.1.2. Khảo sát đặc tính sinh học của hai chủng vi sinh vật nghiên cứu

- Ta đánh giá chất lượng nấm men bánh mì *S. cerevisiae* thông qua khả năng làm nở bột nhào của chúng.

- Tiến hành chuẩn bị mẫu như mục 2.2.2. Kết quả được trình bày tại Hình3.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn hoạt lực làm nở khối bột nhào của nấm men bánh mì *S. cerevisiae*

Dựa vào kết quả trên, tôi thấy rằng khối bột nhào ban đầu có thể tích là 36,5ml, sau 2 giờ đạt độ nở cao nhất, thể tích lớn nhất của khối bột nhào đạt được là 88ml. So sánh với chỉ tiêu chất lượng của nấm men bánh mì theo tài liệu [1] tôi thấy hoạt lực làm nở của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* tương đối cao.

Xác định khả năng tạo khối đông thạch dừa của vi khuẩn *Acetobacter xylinum*

Chuẩn bị mẫu giống như ở mục 2.2.2c, đo mẫu trong 5 ngày lên men thứ 4, 5, 6, 7, 8 và thu được kết quả ở Bảng 1.

Bảng 2. Khả năng tạo khối đông của vi khuẩn *Acetobacter xylinum* theo thời gian

Thời gian, ngày	Khối lượng khối đông thu được, g
5	1,7
6	2,2
7	2,3
8	2,4

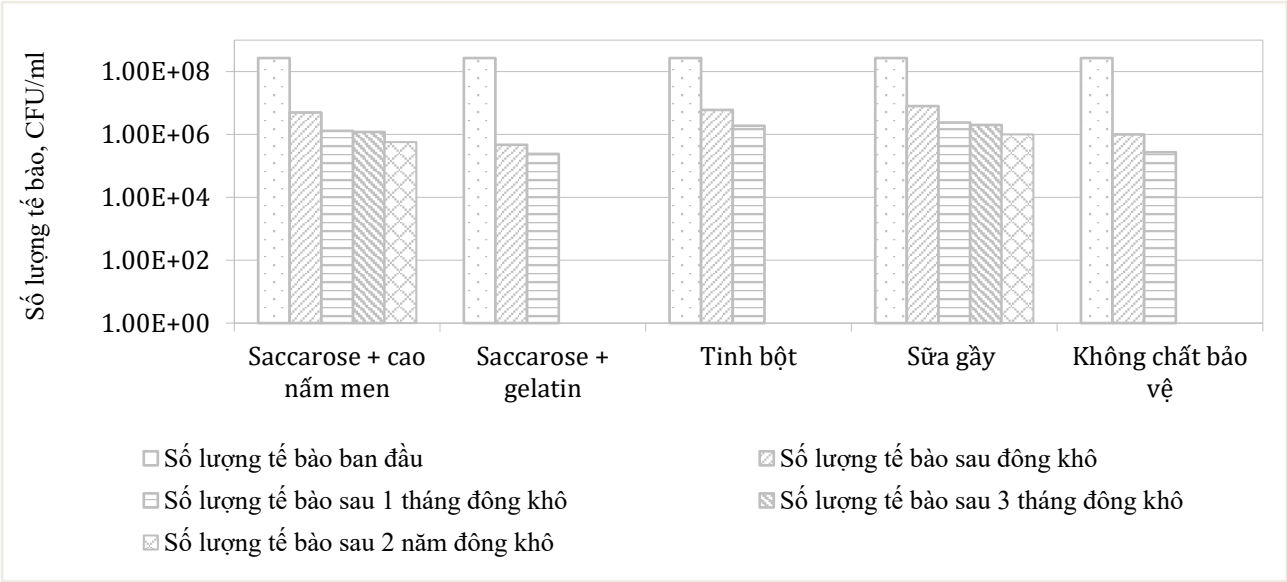
Từ kết quả trên tôi nhận thấy rằng, sau 6 ngày lên men thì khối đông tạo thành lớn, từ ngày thứ 7 trở đi khối đông cũng tiếp tục được hình thành nhưng với tốc độ chậm hơn trước.

3.2. Bảo quản nấm men bánh mì *S.cerevisiae* và vi khuẩn *A.xylinum* bằng phương pháp đông khô

Mẫu được tiến hành đông khô như mục 2.2.3 được ghi lại ở Hình 4.

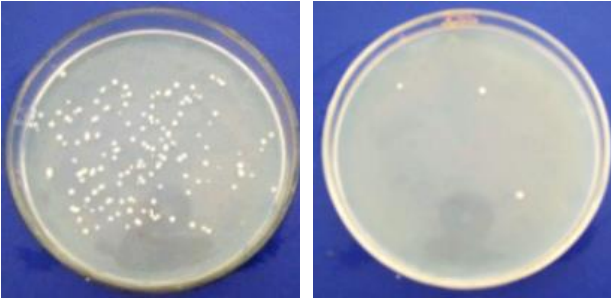


Hình 4. Mẫu nấm men và vi khuẩn đông khô

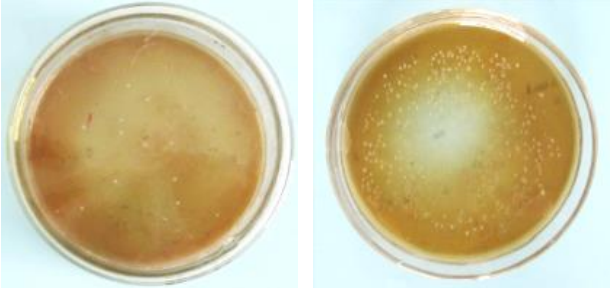


Hình 7. Đồ thị biểu diễn khả năng sống sót của *S.cerevisiae* theo thời gian bảo quản bằng phương pháp đông khô

Để hoạt hóa lại mẫu, dùng sữa gầy tiết trùng và hình ảnh hoạt hóa lại sau khi đông khô 3 tháng được trình bày ở Hình 5 và Hình 6.



Hình 5. Hình ảnh khuẩn lạc nấm men trước và sau khi đông khô



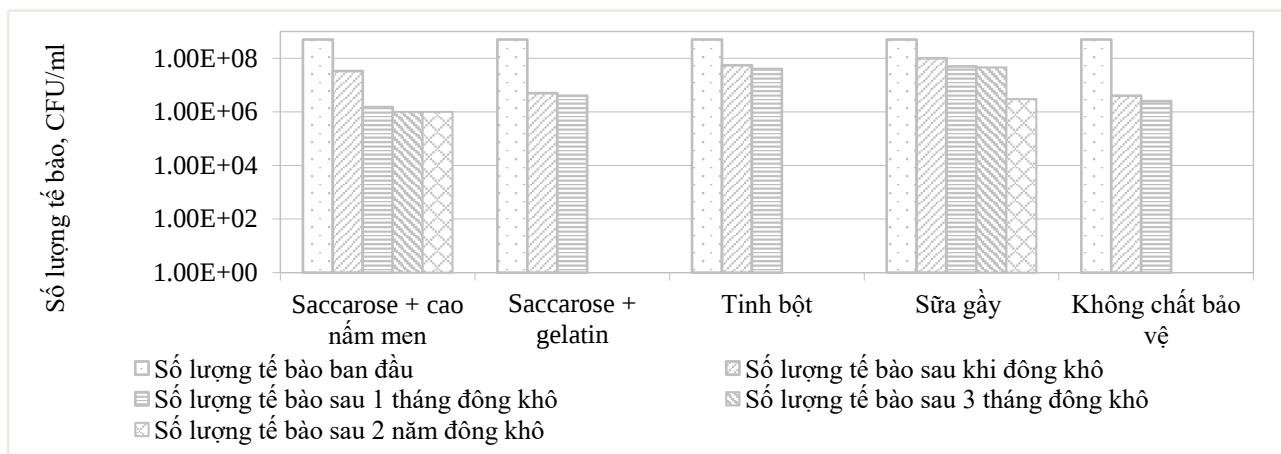
Hình 6. Hình ảnh khuẩn lạc vi khuẩn trước và sau khi đông khô

- Các khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch có đặc điểm hình thái giống hệt hình thái của chủng nấm men và vi khuẩn trước khi đông khô, số lượng khuẩn lạc nhiều. Điều này chứng tỏ phương pháp đông khô với những những chất bảo vệ này phù hợp với quá trình bảo quản hai chủng vi khuẩn và nấm men nghiên cứu.

3.3. Kiểm tra khả năng sống sót và đặc tính sinh học của các chủng nghiên cứu sau khi đông khô và bảo quản

3.3.1. Khả năng sống sót nấm men bánh mì *S.cerevisiae*, vi khuẩn *A.xylinum* sau khi đông khô và bảo quản

Chúng tôi tiến hành xác định số lượng tế bào nấm men và vi khuẩn sống sót bằng cách đếm khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch, thu được kết quả biểu diễn ở đồ thị Hình 7 và Hình 8.



Hình 8. Đồ thị biểu diễn khả năng sống sót của *A.xylinum* theo thời gian bảo quản bằng phương pháp đông khô

Bảng 3. Đặc tính sinh học của các chủng vi sinh vật sau thời gian bảo quản bằng phương pháp đông khô

Thời gian khảo sát	Hoạt lực làm nở khối bột nhào của <i>S.cerevisiae</i> trong 2 giờ		Khả năng tạo khối đông của <i>A.xylinum</i>	
	Thể tích, ml	% so với ban đầu	Khối đông tạo thành, g	% so với ban đầu
Trước khi đông khô	88	100	2,4	100
Sau 3 tháng	84	95,4	2,2	91,6
Sau 2 năm	83	94,3	2,2	91,6

❖ Nhìn vào đồ thị Hình 8 ta có một số nhận xét như sau:

- Sau quá trình đông khô, khả năng sống sót của các tế bào nấm men đã giảm xuống đáng kể, số lượng ban đầu là $2,7 \cdot 10^8$ CFU/ml giảm chỉ còn $10^6 - 8 \cdot 10^6$ CFU/ml trong hầu hết các trường hợp, với kết quả thu được tốt nhất khi đông khô với chất bảo vệ sữa gầy là $8 \cdot 10^6$ CFU/ml.

- Sau khi đông khô, khả năng sống sót của tế bào nấm men khi không có chất bảo vệ thấp, chỉ 10^6 CFU/ml còn khả năng sống sót của nấm men sau khi đông khô trong trường hợp có 10% sữa gầy là $8 \cdot 10^6$ CFU/ml.

Theo tài liệu tham khảo [2] thì việc bổ sung các chất bảo vệ, chẳng hạn như các loại đường, làm giảm lượng nước liên kết trên bề mặt của các protein nấm men. Các chất bảo vệ có thể hình thành liên kết hydro với protein, do đó thay thế cho nước để duy trì sự ổn định của các protein. Khi sử dụng đường saccharose kết hợp với cao nấm men thì thấy hiệu quả bảo vệ tăng lên đáng kể, khả năng sống sót sau đông khô là $5 \cdot 10^6$ CFU/ml.

- Với chất bảo vệ là tinh bột, ta nhận thấy khả năng sống sót của nấm men sau khi đông khô là $6 \cdot 10^6$ CFU/ml, chỉ thấp hơn so với chất bảo vệ là sữa gầy. Kết quả này có thể được giải thích do tinh bột có khả năng giữ lại một lượng nước nhiều hơn. Nước này chỉ ở dạng liên kết nên vi sinh vật không thể nào hoạt động được nhưng lượng nước này đảm bảo khả năng sống sót của vi sinh vật.

- Trong tất cả các chất bảo vệ thì sau quá trình đông khô, sữa gầy cho kết quả tốt nhất, số lượng tế bào nấm men sống là $8 \cdot 10^6$ CFU/ml. Sự hiện diện của một lượng lớn protein và các muối phosphate trong sữa có thể đã cung cấp một bổ sung lớp phủ bảo vệ cho các tế bào trong quá trình lạnh đông và sấy khô. Đồng thời, sữa gầy cho khả năng

sống sót tốt nhất vì nó tạo ra sản phẩm đông khô có cấu trúc xốp làm cho việc bù nước dễ dàng hơn [2].

- Sau thời gian bảo quản 1 tháng, khả năng sống sót của nấm men tiếp tục giảm nhưng tỉ lệ giảm không đáng kể với các mẫu có chất bảo vệ.

Và sau 3 tháng bảo quản, kiểm tra lại mẫu có chất bảo vệ là sữa gầy thì thấy tỉ lệ sống sót là 0,88%, mẫu không chất bảo vệ là 0,09%, Như vậy tỉ lệ sống sót sau 3 tháng giảm đi rất ít so với 1 tháng. Còn mẫu không chất bảo vệ thì sau 3 tháng bảo quản nấm men không còn sống sót nữa.

Sau 2 năm bảo quản, đem kiểm tra lại thì thấy, mẫu sữa gầy số lượng tế bào sau khi hoạt hoá vẫn còn 10^6 CFU/ml và mẫu saccharose + cao nấm men là $5,7 \cdot 10^5$ CFU/ml. Với tỉ lệ sống sót như thế này đã đảm bảo được vai trò bảo quản giống.

❖ Trên đồ thị hình 8 biểu diễn khả năng sống sót của vi khuẩn *A.xylinum* ta có nhận xét như sau:

- Số lượng tế bào vi khuẩn cũng giảm đi sau quá trình đông khô nhưng tỉ lệ giảm ít hơn so với nấm men. Ví dụ như với mẫu vi khuẩn đông khô trong chất bảo vệ là sữa gầy thì tỉ lệ sống sót sau đông khô là 12%, cao hơn so với nấm men là 2,96%. Cơ chế bảo vệ của các chất bảo vệ cũng có hiệu quả tương tự như đối với chủng nấm men. Các mẫu có chất bảo vệ khác của chủng vi khuẩn cũng đều cao hơn so với nấm men. Điều này có thể là do sự khác nhau ở cấu trúc màng tế bào của vi khuẩn và nấm men. Kết quả này một lần nữa khẳng định lại nghiên cứu của tài liệu [5] cho rằng: Nấm men, vi khuẩn có khả năng sống sót khác nhau sau quá trình đông khô. Trong nghiên cứu này thì tỉ lệ sống sót của nấm men *S.cerevisiae* sau đông khô là 8%, của vi khuẩn *Enterococcus faecium* là 85%, của *Pseudomonas putida* 33%.

Và sau 3 tháng bảo quản thì tỉ lệ sống sót của vi khuẩn giảm không đáng kể so với sau khi đông khô. Mẫu không có chất bảo vệ thì tế bào vi khuẩn không còn sống sót nữa.

Đến sau 2 năm bảo quản, chúng tôi hoạt hoá lại thì thấy kết quả là mẫu có chất bảo vệ sữa gầy và hỗn hợp saccarose + cao nấm men lần lượt có số lượng tế bào là $4,6.10^7$ CFU/ml và 10^6 CFU/ml, chứng tỏ lượng tế bào vi khuẩn vẫn còn sống sót ở mức cao đảm bảo thành công cho việc bảo quản giống.

3.3.2. Ảnh hưởng của quá trình đông khô và bảo quản đến đặc tính sinh học của nấm men bánh mì *S.cerevisiae* và vi khuẩn *A.xylinum*

Sau khi hoạt hoá lại các mẫu đông khô và bảo quản, đem mẫu này kiểm tra đặc tính sinh học của chúng, thu được kết quả như ở Bảng 3.

Kết quả ở Bảng 3.4 cho thấy hoạt lực làm nở bột nhào của nấm men *S.cerevisiae* và khả năng tạo cellulose của

A.xylinum có bị giảm sau khi đông khô và bảo quản 3 tháng và 2 năm nhưng giảm không đáng kể, thậm chí với vi khuẩn thì không hề giảm, tất cả đều đạt trên 90% so với hoạt lực ban đầu. Điều này chứng tỏ rằng hai chủng nghiên cứu này thích hợp với phương pháp đông khô.

3.4. Sử dụng vi khuẩn *A.xylinum* sau đông khô để sản xuất sản phẩm thạch dừa

Sau khi có được các chủng giống vi sinh vật như trên và tìm ra được phương pháp bảo quản thích hợp, chúng tôi đã tiến hành lên men thử nghiệm tạo sản phẩm thạch dừa từ vi khuẩn *Acetobacter xylinum* được bảo quản bằng phương pháp đông khô theo quy trình công nghệ sau và so sánh sản phẩm thu được với thạch dừa lên men từ vi khuẩn trước khi đông khô.

Sơ đồ quy trình công nghệ lên men thạch dừa:

Vi khuẩn *A.xylinum* → Đông khô và bảo quản ở 4°C → Hoạt hoá lại →
 Nước dừa → Lọc → Trộn đều → Đun sôi 15 phút → Để nguội → Cho axit axetic vào → Cấy giống → Lên men → Thạch dừa



Hình 8. Hình ảnh sản phẩm thạch dừa

Sau thời gian bảo quản chúng tôi hoạt hoá giống và lên men thạch dừa, sản phẩm tạo thành vẫn giống như ban đầu. Điều này chứng tỏ rằng, đặc tính sinh học của chủng giống này không bị thay đổi, không bị thay đổi đặc tính di truyền trong quá trình bảo quản. Đây là một trong hai tiêu chí quan trọng của việc bảo quản giống.

4. Kết luận

- Phương pháp đông khô thích hợp để bảo quản hai chủng nấm men bánh mì *S. cerevisiae* và vi khuẩn *A. xylinum* với thời gian bảo quản 2 năm vẫn đảm bảo tỉ lệ sống sót trên 10^6 CFU/ml, hoạt lực sinh học của chúng thay đổi không đáng kể.

- Chất bảo vệ tốt nhất cho quá trình đông khô là sữa gầy 10%.

- Chúng tôi đã sử dụng vi khuẩn sau đông khô để lên men thử nghiệm tạo sản phẩm thạch dừa từ vi khuẩn *Acetobacter xylinum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Đức Lương (2002), Công nghệ Vi sinh vật tập 2, Nhà xuất bản TP. Hồ Chí Minh.
- [2] Abadias M., Benabarre A., eixidoN. T, Usall J., Vinas I. (2001), "Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*", *International Journal of Food Microbiology*, 65, pp. 173–182.
- [3] Safronova V.I., Novikova N.I. (1996), "Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen –freezing", *Journal of Microbiological Methods*, 24, pp. 231 – 237.
- [4] Stefan Toegel, Sharareh Salar-Behzadi, Andrea Horaczek-Clausen, Helmut Viernstein (2010), "Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization", *Journal of Invertebrate Pathology*, 105, pp.16–23.
- [5] Yukie Miyamoto-Shinohara, Junji Sukenobe, Takashi Imaizumi, Toro Nakahara (2006), "Survival curves for microbial species stored by freeze-drying", *Cryobiology*, 52, pp. 27 – 32.
- [6] Gabriela Zárate, María Elena Nader-Macias (2006), Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules, *Process Biochemistry*, 8, pp. 1779–1785
- [7] Stephanie Hesse, Tetsuo Kondo (2005), "Behavior of cellulose production of *Acetobacter xylinum* in 13C-enriched cultivation media including movements on nematoc ordered cellulose templates", *Carbohydrate Polymers*, 60, pp. 457 – 465.

(BBT nhận bài: 03/03/2014, phản biện xong: 31/03/2014)