

## **PRZEŻYWALNOŚĆ SZCZEPU *LACTOBACILLUS PLANTARUM* K W CZASIE SUSZENIA FLUIDYZACYJNEGO I PRZECHOWYWANIA**

**Antoni Miecznikowski, Krystyna Zielińska**

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego,

02-532 Warszawa ul. Rakowiecka 36,

antoni.miecznikowski@ibprs.pl

### **Streszczenie**

Utrwalanie biomasy bakterii z gatunku *Lactobacillus plantarum* w procesie obejmującym mieszanie bakterii z wilgotnymi nośnikami, takimi jak ziemniaczana skrobia rozpuszczalna, glukoza, laktoza i sacharoza, a następnie granulowanie i suszenie w suszarce fluidyzacyjnej powoduje znaczne osłabienie komórek bakterii, co skutkuje szybkim obniżaniem się aktywności biologicznej preparatów w trakcie ich przechowywania. Dodatek substancji ochronnych – sorbitolu i betainy do biomasy przed zmieszaniem jej z nośnikami nie eliminuje efektu letalnego w trakcie przechowywania, a korzystnym efektem działania tych substancji jest jedynie podwyższenie przeżywalności w czasie dehydratacji o około 30%. Przeżywalność komórek bakterii w czasie 12 miesięcy przechowywania jest nadal niska – na poziomie znacznie niższym niż 10%.

Stwierdzono, że modyfikacja technologii, polegająca na oddzielnym przygotowaniu granulowanego nośnika o określonym składzie, a następnie nanoszeniu na niego biomasy w trakcie procesu fluidyzacji w temperaturze 30-33°C, powoduje niewielką poprawę przeżywalności bakterii w czasie dehydratacji ale znacząco podwyższa przeżywalność bakterii w czasie przechowywania preparatów. Liczba bakterii w preparatach wykonywanych dwuetapowo zmniejszała się o niecałe 20% w czasie 3 miesięcy przechowywania w warunkach chłodniczych (temperatura 8°C), podczas gdy w preparatach zawierających substancje ochronne, ale wykonywanych jednoetapowo, po tym samym okresie przechowywania liczba bakterii malała o ponad 80%.

**Słowa kluczowe:** *Lactobacillus plantarum*, suszenie fluidyzacyjne, przeżywalność bakterii

## **SURVIVABILITY OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* K DURING FLUIDIZED BED DRYING AND STORAGE**

### **Summary**

Preservation of biomass of bacteria from *Lactobacillus plantarum* species in the process, which covers mixing the bacteria with wet carriers such as soluble potato starch, glucose, lactose and saccharose and then, their granulation and drying in fluidized bed dryer causes a considerable depletion of bacterial cells what, in consequence, results in a quick decrease of biological activity of the preparations during their storage. The addition of protective substances – sorbitol and betaine – to biomass before its mixing with the carriers does not eliminate the lethal effect during the storage; one favourable effect of the influence of the mentioned substances results only in the rise of survivability by ca. 30% during hydration. The survival rate of bacterial cells during 12 months of storage remains still low, i.e. it is found on the level lower than 10%.

It was found that modification of technology, consisting in separate performance of granulated carrier with a specified composition and then, carrying the biomass over it during the fluidization process at temperature of 30-33°C, causes a small improvement of survivability of bacteria during hydration but a considerable rise of the survivability during the storage of the preparations. The number of bacteria in the preparations, performed in two stages was decreased by less than 20% during 3 months of storage under refrigeration conditions (temperature of 8°C) whereas in the preparations containing the protective substances, but produced in one stage, the number of bacterial cells was decreased by more than 80% after the same period of storage.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum*, fluidized bed drying, survivability of bacteria

### **WSTĘP**

W Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego opracowano technologie produkcji grupy preparatów probiotycznych i do kiszzenia pasz. Są to preparaty wytwarzane pod postacią suchych granulatów, których aktywnym składnikiem są kultury bakterii pozostające w stanie anabiozy. Jednym z podstawowych parametrów determinujących wartość tych preparatów jako produktów handlowych jest ich trwałość, której wskaźnikiem jest aktywność biologiczna niezmienna lub zmniejszająca się w niewielkim stopniu, w jak najdłuższym czasie od momentu wyprodukowania.

Wszystkie procesy fizyko-chemiczne zachodzące podczas dehydratacji nie pozostają bez wpływu na aktywność biologiczną komórek bakterii, zarówno bezpośrednio po zakończeniu suszenia jak i w trakcie przechowywania preparatów. Skład preparatów w dużej mierze uzależniony jest od ich funkcji aplikacyjnej oraz od sposobu dozowania, tzn. od tego czy preparaty przeznaczone są do kisenia pasz czy mają być stosowane jako probiotyki dla określonych grup zwierząt. Z przeznaczeniem preparatów wiąże się potrzeba ich dobrej lub powolnej rozpuszczalności, natomiast ze sposobu dozowania (stosowanie wodnych roztworów przetrzymywanych przez wiele godzin w trakcie sporządzania kiszzonek) wynika konieczność stabilności wodnych zawiesin nierozpuszczalnych składników preparatów. Uzyskanie dobrej rozpuszczalności preparatów wymusza zastosowanie nośników rozpuszczalnych, a potrzeba szybkiego wznowienia przez drobnoustroje funkcji życiowych, niemal bezpośrednio po ich uwodnieniu, determinuje zastosowanie mono- bądź polisacharydów - substratów łatwo metabolizowanych przez bakterie fermentacji mlekowej. Z kolei wymogi technologiczne procesu produkcji preparatów narzucają konieczność użycia substancji mogących, w mieszaniu składników, pełnić rolę substancji „strukturalnych”, które w trakcie procesu mieszania wilgotnej biomasy ze wszystkimi komponentami umożliwiają płynięcie uzyskanej pasty i jednocześnie zapewniają powstawanie cech korzystnych w trakcie procesu granulacji. W opracowanej technologii taką rolę spełnia skrobia rozpuszczalna, będąca polisacharydem częściowo metabolizowanym przez bakterie, a jednocześnie dobrze tolerowanym przez wszystkie grupy zwierząt, dla których przeznaczone są probiotyki opracowane w IBPRS. Jednak obecność cukrów (glukozy, sacharozy), zastosowanych w preparatach jako nośniki, powoduje powstawanie dużego ciśnienia osmotycznego w wilgotnych preparatach i w konsekwencji prowadzi do dużej śmiertelności komórek bakterii.

Jednym z istotnych problemów przemysłu biotechnologicznego jest otrzymywanie stabilnych preparatów kultur bakteryjnych jak najniższym kosztem. Żywe mikroorganizmy należą do najbardziej złożonych układów heterogenicznych poddawanych suszeniu, z czego wynika złożoność problemów związanych z utrwalaniem biomasy bakteryjnej.

Biomasa bakterii fermentacji mlekowej, wydzielona z płynu pohodowlanego, zawiera w większości żywe komórki bakterii. Jednak pomimo przechowywania takiej biomasy w obniżonej temperaturze (około 8°C) po pewnym czasie żywotność populacji znacznie się zmniejsza, co stwierdzono na podstawie własnych badań (dane niepublikowane) oraz potwierdzają inne źródła [Müller, 1990]. Konieczność obecności wody w żywych komórkach wynika z faktu, że jest ona składnikiem struktur komórkowych, rozpuszczalnikiem enzymów,

substancji pokarmowych, krystaloidów i koloidów [Jasiński, Kilarski, 1987]. Wywołany procesem suszenia ruch ciepła i masy w układzie o początkowo pełnej aktywności biologicznej, jakim są komórki bakterii (w których woda stanowi 75-85% objętości) wydzielone z płynu pohodowlanego bezpośrednio po zakończeniu hodowli, narusza pierwotny stan ustalony, a zmiany zachodzące w wyniku obniżania wilgotności ustają dopiero w momencie osiągnięcia przez organizm i środowisko równowagi termodynamicznej. Transport ciepła i masy w komórce, a także pomiędzy komórką i otoczeniem, przebiega w sposób specyficzny, ponieważ towarzyszą mu przemiany fizykochemiczne i biologiczne, typowe dla danego szczepu oraz fazy wzrostu, w jakiej się on znajduje [Chmiel, 1994]. W czasie odwadniania organizm traci wodę wolną, aktywną biologicznie, a pozostaje w nim woda nieaktywna biologicznie, związana w postaci otoczek grup polarnych substancji stanowiących szkielet żelu protoplazmy. W wodzie nieaktywnej nie rozpuszczają się substancje znajdujące się w przestrzeniach wolnych struktury żelowej i jest to jedną z przyczyn zatrzymania przemian biochemicznych. Przemiana białek protoplazmy z hydrozolu w hydrożel, postępująca w miarę odprowadzania wody z komórki, prowadzi do zahamowania funkcji życiowych układów, w stopniu uzależnionym od ilości pozostawionej wody [Kudra, Strumiłło, 1998]. W nowym stanie ustalonym - anabiozie, który można zdefiniować jako stan okresowego, odwracalnego zatrzymania funkcji życiowych, a nazywanym inaczej stanem życia utajonego, wszelkie procesy życiowe odbywają się w minimalnym stopniu, natomiast w przypadku zaistnienia odpowiednich warunków ich intensywność może wzrosnąć do normalnego poziomu [Nicklin i in., 2004].

Biorąc pod uwagę właściwości fizyczne koloidu, materiały mikrobiologiczne należy zakwalifikować do ciał koloidalnych o strukturze kapilarno-porowatej, z wszystkimi postaciami związania wody z materiałem. Struktura płynu komórkowego ciągle się zmienia, co wynika z ruchliwości wody. Woda odgrywa istotną rolę w stabilizacji konformacji białek, a dzięki oddziaływaniu wody, białka i tłuszcze łączą się tworząc lipoproteidy [Tutowa, Kuc, 1991]. Pod wpływem podwyższonej temperatury w części uwodnionej pękają wiązania wodorowe i zachodzą zmiany w konfiguracji białek. Szczególnie ważną rolę odgrywa woda w membranach, które mogą powstawać tylko w środowisku wodnym, a woda stanowi 30-50% ich masy, przy czym 25-30% wody w membranach występuje w postaci ściśle związanej z innymi cząsteczkami. Przepuszczalność membran naturalnych dla wody jest duża, ale transport wody w układach biologicznych jest niezwykle powolny i całkowicie zależny od gradientu stężenia i ciśnienia oraz praw dyfuzyjnego oddziaływania z innymi składnikami. Odwadnianie powoduje nie tylko usuwanie wody ze środowiska, w którym

przebiegają reakcje biochemiczne, lecz także wpływa na głębokie zmiany strukturalne na poziomie biopolimerów, membran i organów, w istotnym stopniu zmieniając ich oporność na działanie czynników zewnętrznych. Niskie i wysokie temperatury, promieniowanie, zmiany ciśnienia, lepkości i pH środowiska oraz inne czynniki fizyczne powodują uszkodzenie protoplazmatycznej struktury komórek i wywołują zaburzenia w procesach przemiany mogące doprowadzić do zamierania tych komórek. Zamieranie mikroorganizmów może zachodzić na skutek naruszenia struktury ściany komórkowej, denaturacji termicznej białek komórkowych, zmian stężenia substancji rozpuszczalnych w poszczególnych częściach układu lub wzrostu lepkości środowiska, a w konsekwencji hamowania procesów wymiany w układzie, aż do ich całkowitego przerwania.

W procesach przemysłowych drobnoustroje wprowadza się w stan anabiozy głównie w celu przedłużenia ich aktywności biologicznej i biochemicznej, jednak w rzeczywistości anabioza wywołuje w części populacji komórek efekt letalny, którego przyczyną może być między innymi destrukcja i deformacja błony komórkowej lub denaturacja białka komórkowego [Bayrock, Ingledew, 1997]. Biomateriały czułe na działanie wysokiej temperatury muszą być suszone z zastosowaniem takich technik, które nie powodują obniżenia aktywności biologicznej i biochemicznej, zapewniając jednocześnie obniżenie zawartości i aktywności wody. Techniki prowadzące do uzyskania odwodnionego biomateriału wysokiej jakości są bardzo zróżnicowane. Oprócz wyboru właściwej metody suszenia bardzo istotne jest również zastosowanie dodatku membranoaktywnych czynników regulacyjnych, takich jak: węglowodany, hydrokoloidy, serwatka czy mleko w proszku [Abadias i in., 2001]. Stwierdzono również, że korzystny efekt w postaci zwiększenia przeżywalności drobnoustrojów w czasie procesu odwadniania można uzyskać poprzez zastosowanie immobilizacji komórek, np. w alginianie wapnia [Turker, Hamamci, 1998].

W produkowanych w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego preparatach probiotycznych i do kiszenia pasz jako wypełniacze stosowane są cukry, takie jak glukoza, laktoza czy sacharoza. Dokładny mechanizm uczestniczenia cukrów w utrzymaniu integralności odwodnionych biomateriałów jak dotąd nie został całkowicie wyjaśniony, ale postawiono dwie hipotezy. Według pierwszej z nich podczas procesu odwadniania cukry łączą się z białkami i zastępując cząsteczki wody powodują utrzymanie struktury białek nie pozwalając na ich denaturację [Saleki-Gerhardt i in., 1995]. Na podstawie tej teorii można wnioskować, że większość mono-, di- i trisacharydów można zastosować do ochrony wrażliwych materiałów przed negatywnymi skutkami suszenia. Praktyka pokazuje jednak, że efekt poprawy stabilności biomateriałów (enzymów, liposomów, leków i drobnoustrojów)

suszonych z różnymi węglowodanami jest zróżnicowany. Wiadomo np., że obecność sacharozy i sorbitolu wpływa korzystnie na aktywność biologiczną preparatów, chroniąc układ enzymatyczny komórek przed utlenianiem [Smirnoff, Cumbes, 1989]. Jednak sorbitol charakteryzuje się niekorzystnym działaniem w warunkach obniżania temperatury do wartości  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Wielu badaczy stwierdza, że spośród węglowodanów najefektywniejsze działanie ochronne wykazuje trehaloza, maltoza i laktoza, a następnie sacharoza, glukoza, fruktoza i sorbitol [Leslie i in., 1995; Diniz-Mendes i in., 1999; Cardona i in., 2002]. Ustalono, że przy zastosowaniu suszenia próżniowego oraz liofilizacji biomasy bakterii z gatunku *Lactobacillus plantarum* dodatek węglowodanów jest wręcz niezbędny (Augustynowicz, Szaraniec i Kaszycki, 2004). Wyniki innych badań sugerują, że np. dodatek laktozy, sacharozy lub adonitolu powoduje wzrost przeżywalności *Lactobacillus plantarum* w czasie liofilizacji, w zakresie od około 1 do 34-86 % [Moriuchi, 1974; Kilara, Shanani i Das, 1976; Font de Valdez i in., 1985; Champagne i in., 1991]. Suszenie preparatów bakteryjnych z dodatkiem sorbitolu powoduje nawet wzrost przeżywalności do poziomu znacznie przekraczającego 90% [Leviense, Riet K-van't, 1994].

Alternatywny punkt widzenia, dotyczący pozytywnego wpływu cukrów na labilne układy biologiczne, wiąże się ze skłonnością cukrów do przechodzenia w amorficzny stan szklisty. Taka forma, sama w sobie, w wystarczającym stopniu stabilizuje suszony materiał. Granica pomiędzy ruchomym i stabilnym stanem układu jest ściśle związana ze stężeniem cukru [Slade, Levine, 1995].

Ciekawych informacji na temat ochronnego działania różnych substancji dostarczają badania nad bakteriami bytującymi w ekstremalnych warunkach. Przykładowo badania piezopsychrofilnej bakterii *Colwellia psychroerythraea* 34H, której DNA został całkowicie zsekwencjonowany w 2005 roku, pozwoliły na identyfikację białek najistotniejszych dla przeżycia komórek. Badania te dostarczyły też cennych informacji dotyczących specyficznych substancji umożliwiających przeżycie w warunkach niskich temperatur, wysokich ciśnień i niedoboru substancji odżywczych w środowisku. Do substancji tych należą między innymi betaina i karnityna [Turkiewicz, 2006]. Wymieniona tutaj betaina należy do bardziej znanych substancji ochronnych – osmoregulacyjnych, które oprócz umożliwienia komórkom utrzymywania odpowiedniego ciśnienia turgoru podczas stresu osmotycznego, wpływają pozytywnie na stabilizację błon komórkowych i struktury białek [Rudolph i in., 1986; Kets, de Bont 1994; Powalowski i in., 2002].

W świetle doświadczeń, wykonywanych systematycznie w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, oraz wyników prac innych badaczy można stwierdzić,

że dodatek cukrów stosownych w opracowanej technologii produkcji biopreparatów może stwarzać również pewne niekorzystne implikacje związane z przeżywalnością bakterii i stabilnością preparatów [Miecznikowski, Lenart, 2010]. W odwadnianych mieszaninach składników biopreparatów następuje rekrytalizacja cukrów, w efekcie której zachodzi prawdopodobnie uszkodzenie części komórek i pogorszenie stanu fizjologicznego całej ich populacji. Skala tego zjawiska nie jest jeszcze znana, a sformułowana teza wymaga weryfikacji i opracowania sposobów zapobiegania temu procesowi. Niepublikowane wyniki badań prowadzonych w IBPRS wskazują, że dodatek hydrokolidów polisacharydowych może pozytywnie oddziaływać na stabilność produkowanych preparatów. Wykonane doświadczenia dotyczą zastosowania gumy ksantanowej. Łańcuch główny cząsteczki gumy ksantanowej zbudowany jest z jednostek D-glukozy połączonych wiązaniami  $\beta$  (1-4) tak samo jak to ma miejsce w łańcuchu celulozy. Mniej więcej przy co trzeciej jednostce D-glukozy od łańcucha głównego odchodzą krótkie odgałęzienia boczne, zbudowane z dwóch jednostek D-mannozy i jednej cząsteczki kwasu glukuronowego. Taka budowa sprawia, że łańcuchy gumy ksantanowej są raczej sztywne, co zapewnia im niezwykłą stabilność i oporność na temperaturę, kwasy i zasady. Wiele mikroorganizmów wytwarza w sposób naturalny powłoki zbudowane z polisacharydów w celu odizolowania się od innych organizmów lub zachowania odpowiedniej wilgotności w niesprzyjających warunkach. Powłoki te tworzą dookoła mikroorganizmu warstwę żelu lub, przy niedostatku wody, ściśle przylegający film, który zabezpiecza komórkę przed wysuszeniem oraz umożliwia ponowną rehydrację [Kowalski, Sikora, 2004]. Wykorzystanie przez analogię takich naturalnych zjawisk występujących w przyrodzie może zaowocować oczekiwanymi rezultatami w postaci podwyższenia stabilności biopreparatów, jednak teza ta wymaga eksperymentalnego potwierdzenia.

### **CEL PRACY**

Celem pracy było określenie wpływu zastosowanych nośników i substancji ochronnych oraz sposobu nanoszenia biomasy na nośnik na przeżywalność bakterii w czasie suszenia fluidyzacyjnego i przechowywania w warunkach chłodniczych.

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badany mikroorganizm to *Lactobacillus plantarum* K – KKP/593/p – szczep wyizolowany z środowiska naturalnego w Zakładzie Technologii Fermentacji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, charakteryzujący się zdolnością syntetyzowania zewnątrzkomórkowych enzymów amylolitycznych oraz wysoką dynamiką syntezy kwasu mlekowego.

Biomasa bakterii *Lactobacillus plantarum* K po zakończeniu hodowli była wydzielana z płynu pohodowlanego poprzez wirowanie w wirówce okresowej Jouan, przy 8661 obr/s i współczynnika zwielokrotnienia przyspieszenia ziemskiego około  $13\,000 \cdot g$ , który, przy odpowiednio dobranym czasie przebywania płynu pohodowlanego w rotorze wirówki, wystarcza do wydzielenia komórek bakterii z płynu. Średnia liczba bakterii w biomacie po wirowaniu wynosiła  $2,3 \cdot 10^{11}$  j.t.k./g.

W pracy przebadano siedem nośników biomasy bakterii o różnych składach. W skład nośników wchodziły następujące substancje: skrobia rozpuszczalna, laktoza, sacharoza (w postaci cukru pudru), glukoza, maltodekstryna niskoscukrzona oraz granulowane mleko w proszku. Jako substancje ochronne stosowano betainę i sorbitol. Doświadczenie przeprowadzono w czterech wariantach: preparat bez dodatku substancji ochronnej – wariant kontrolny oraz badanie wpływu substancji ochronnej – dodatek samego sorbitolu, samej betainy oraz obu substancji łącznie. Substancje ochronne najpierw mieszano dokładnie z biomasą, po czym biomasę mieszano z nośnikami i granulowano, a następnie uzyskany granulaturę suszono fluidyzacyjnie. W otrzymanych biopreparatach oznaczano liczbę bakterii – bezpośrednio po suszeniu oraz po 1, 2, 3, 6 i 12 miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych, w temperaturze około 8°C.

W doświadczeniach stosunek masy biomasy bakterii do masy nośników wynosił od 1 : 13,5, do 1 : 27, z tym, że niezależnie od składu nośników w każdym z nich była skrobia rozpuszczalna. Otrzymywane preparaty miały postać granulatury wykonywanych przy użyciu sit o otworkach 1,5 x 1,5 mm.

Suszenie biopreparatów wykonywano w laboratoryjnej suszarce fluidyzacyjnej o działaniu okresowym. Temperatura powietrza suszącego wynosiła 33-35 °C, a czas suszenia wynosił 20 minut.



Kontrolę powtarzalności przebiegu wszystkich doświadczeń wykonywano poprzez prowadzenie następujących pomiarów parametrów procesu suszenia: oznaczanie zawartości suchej masy w preparatach, pomiary przepływu powietrza, pomiary temperatury wewnątrz złoża fluidalnego oraz pomiary wilgotności powietrza.

Aktywność biologiczną preparatów bezpośrednio po suszeniu i w trakcie przechowywania określano poprzez oznaczanie liczby bakterii fermentacji mlekowej, wyrażanej liczbą jednostek tworzących kolonie (j.t.k./g), dokonywane metodą posiewów na podłożu stałym - MRS.

Przeżywalność bakterii w czasie suszenia i przechowywania, wyrażaną w procentach, określano jako stosunek liczby bakterii oznaczonej w wysuszonym preparacie do początkowej liczby bakterii w wilgotnym preparacie przed suszeniem. W obliczeniach uwzględniano zmianę wilgotności preparatu w czasie suszenia oraz różny stosunek masy składnika biologicznego do masy nośników, w zależności od wariantu przeprowadzanego doświadczenia.

## WYNIKI I DYSKUSJA

W pierwszym etapie pracy przeprowadzono doświadczenia mające na celu stwierdzenie czy czas przebywania komórek bakterii w rotorze wirówki wpływa na aktywność biologiczną uzyskiwanej biomasy. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Wirowaniu poddawano cztery próbki płynu pochodzącego, a wyniki zamieszczono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Aktywność biomasy bakterii uzyskanej po wirowaniu w różnych warunkach

*Activity of bacterial biomass, obtained after centrifugation in different conditions*

Czas wirowania, min	Liczba bakterii, j.t.k./g
15	$2,0 \cdot 10^{11}$
90	$3,4 \cdot 10^{11}$
180	$1,1 \cdot 10^{11}$
270	$3,5 \cdot 10^{11}$

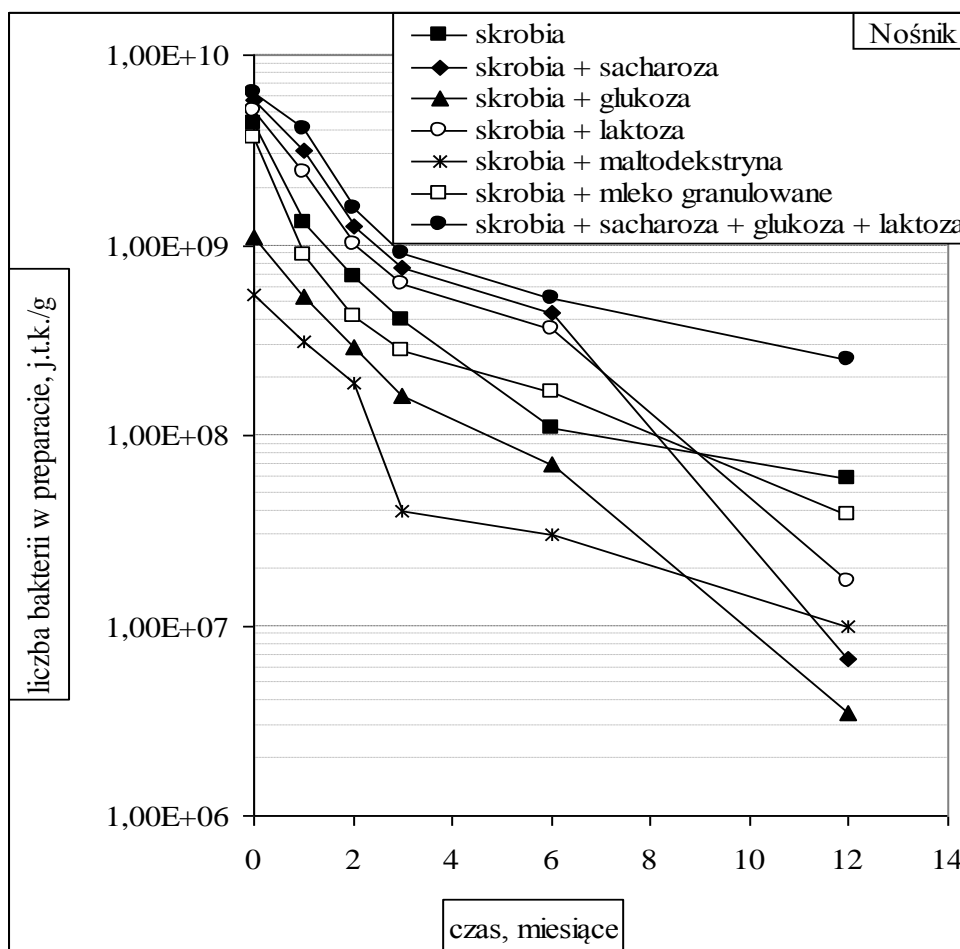
W przebadanym przedziale czasu nie stwierdzono wpływu czasu wirowania na przeżywalność komórek bakterii.

Wymóg dobrej rozpuszczalności preparatów bakterii fermentacji mlekowej determinuje rodzaj substancji, które mogą być wykorzystywane jako nośniki komórek bakteryjnych. Rodzaj nośników uzależniony jest również od stosowanej metody przygotowania preparatów do suszenia oraz techniki samego procesu suszenia. W przypadku suszenia fluidyzacyjnego granulowanych preparatów bakteryjnych stwierdzono, że ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie, łatwą dostępność na rynku i stosunkowo niską cenę oraz wymagania pokarmowe bakterii fermentacji mlekowej, najodpowiedniejszymi nośnikami są substancje z grupy sacharydów. Jednak substancje te mają także wady, do których należy właśnie rozpuszczalność – wymagana w momencie aplikacji preparatów w postaci wodnych zawiesin i niekorzystna w trakcie mieszania wilgotnej biomasy z nośnikami, a następnie granulowania otrzymanej mieszaniny przed suszeniem. Sacharydy rozpuszczalne w kontakcie z środowiskiem wodnym ulegają częściowemu upłynnieniu bądź całkowitemu rozpuszczeniu. Niezależnie od stopnia uwodnienia cukry w trakcie suszenia konwekcyjnego ulegają rekrytalizacji. Proces ten w niekorzystnych warunkach może powodować uszkodzenie błon komórkowych bakterii, a zatem znaczne osłabienie bądź uśmiercanie komórek. W celu przebadania rzeczywistego wpływu tego zjawiska na aktywność biologiczną biomasy w czasie suszenia i przechowywania sporządzono preparaty o różnych składach nośników, po czym porównywano przeżywalność bakterii w tych preparatach, w procesie suszenia oraz przechowywania przez okres 12 miesięcy, w warunkach chłodniczych. Wyniki tych doświadczeń przedstawiono na rysunku 1.

Najwyższą liczbą bakterii bezpośrednio po zakończeniu suszenia -  $6,3 \cdot 10^9$  jtk/g, charakteryzował się preparat zawierający jako nośniki mieszaninę skrobi rozpuszczalnej, sacharozy, laktozy i glukozy, zaś najniższą liczbą bakterii –  $5,5 \cdot 10^8$  jtk/g charakteryzował się preparat, w którym jako nośniki wykorzystano skrobię i maltodekstrynę. Po 12 miesiącach przechowywania największą liczbę bakterii ( $2,5 \cdot 10^8$  jtk/g) oznaczono w preparacie zawierającym jako nośniki skrobię rozpuszczalną, sacharozę, laktozę i glukozę, a najniższą liczbę bakterii ( $3,5 \cdot 10^6$  jtk/g) oznaczono w preparacie, w którym jako nośniki użyto skrobię i glukozę. Przeżywalność, definiowaną jako stosunek oznaczonej liczby bakterii w wysuszonym preparacie do początkowej liczby bakterii w wilgotnym preparacie przed suszeniem przedstawiono na rysunku 2. W obliczeniach uwzględniano zmianę wilgotności preparatu w czasie suszenia.

Spośród przebadanych preparatów najwyższą przeżywalnością w procesie suszenia, wynoszącą 75,8%, charakteryzował się preparat zawierający jako nośniki skrobię rozpuszczalną, sacharozę, laktozę i glukozę; stwierdzono również dobrą przeżywalność

w preparacie zawierającym skrobię i sacharozę oraz skrobię i laktozę – odpowiednio 69,2% i 61,5%. Najgorzej proces suszenia przetrwały komórki bakterii w preparacie zawierającym skrobię i maltodekstrynę – przeżywalność wynosiła jedynie 3,5%.

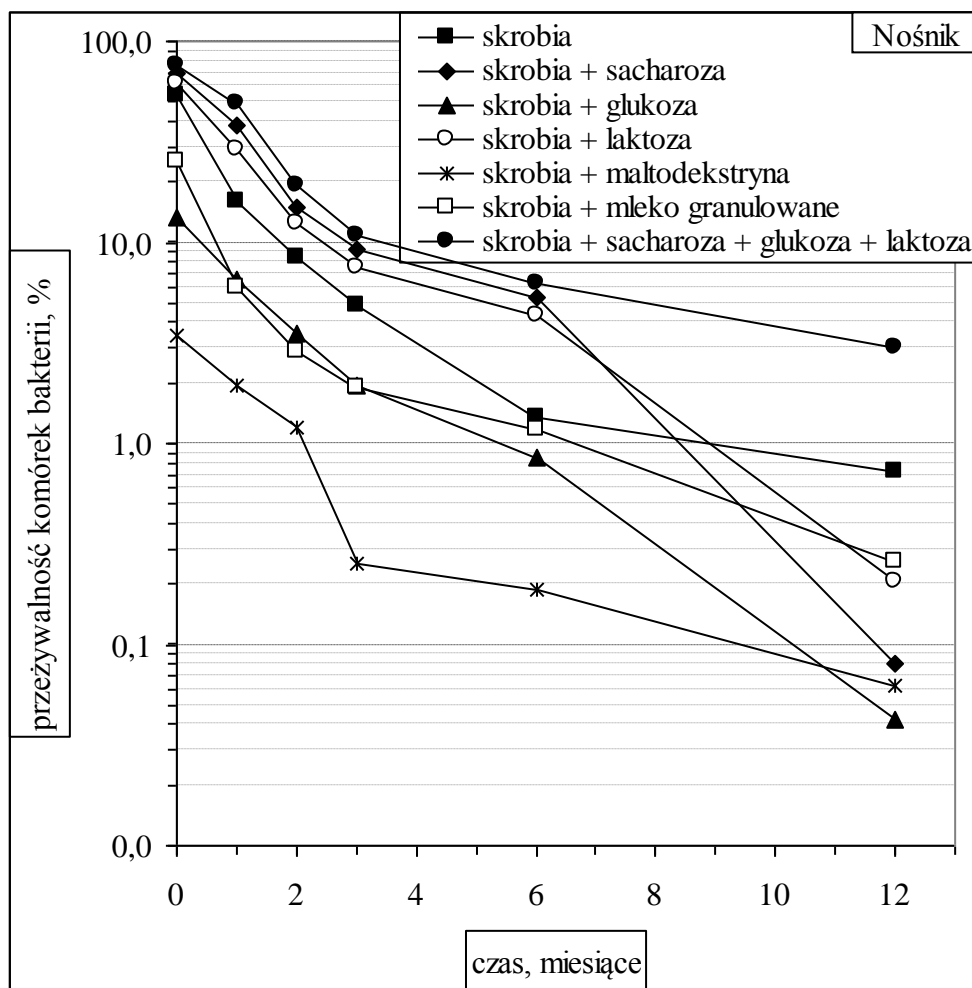


**Rysunek 1.** Liczba bakterii w preparatach bezpośrednio po suszeniu oraz w czasie przechowywania, w zależności od składu nośnika

*The number of bacteria in preparations, directly after drying and during storage period, depending on the composition of the carrier*

Najwyższą przeżywalnością po 12 miesiącach przechowywania (3,0%) charakteryzował się preparat zawierający skrobię rozpuszczalną, sacharozę, laktozę i glukozę jako nośniki, a najniższą przeżywalność stwierdzono w przypadku preparatu wykonanego z zastosowaniem skrobi i glukozy (0,04%). Generalnie należy stwierdzić, że we wszystkich preparatach przeżywalność komórek bakterii, już po trzech miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych, była bardzo niska – w najlepszym, podanym wyżej preparacie wynosiła jedynie 11%, co prawdopodobnie oznacza, że większość komórek, przeżywających proces suszenia

prowadzony w warunkach wykonywanego eksperymentu, jest na tyle osłabiona, że obumiera bardzo szybko w czasie przechowywania.



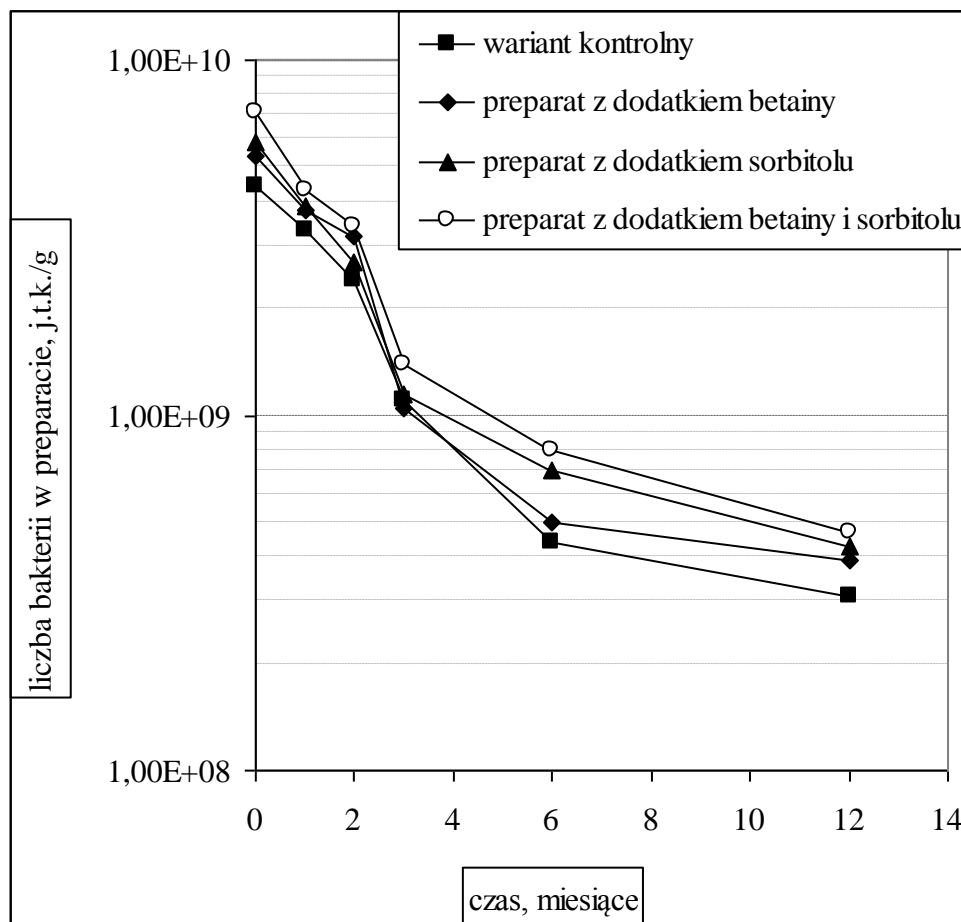
**Rysunek 2.** Przeżywalność bakterii w czasie suszenia i przechowywania przez 12 miesięcy

*Survivability of bacterial during drying and storage for 12 months*

Do dalszych badań wytypowano preparat zawierający jako nośniki: skrobię rozpuszczalną, sacharozę, laktozę i glukozę. Jako substancje ochronne stosowano betainę i sorbitol. Doświadczenie przeprowadzono w czterech wariantach: preparat bez dodatku substancji ochronnej, z dodatkiem sorbitolu, betainy oraz obu substancji łącznie. Wyniki przedstawiono na rysunku 3.

Bezpośrednio po procesie suszenia liczba bakterii w preparatach była następująca: próba kontrolna –  $4,4 \cdot 10^9$  jtk/g, preparat z dodatkiem betainy –  $5,4 \cdot 10^9$  jtk/g, preparat z dodatkiem sorbitolu –  $5,9 \cdot 10^9$  jtk/g, preparat z dodatkiem betainy i sorbitolu –  $7,1 \cdot 10^9$  jtk/g, co odpowiadało przeżywalności bakterii na poziomie: 53,6, 65,8, 71,9, 86,5 %. Po 12 miesiącach

przechowywania preparatów liczba bakterii była następująca: próba kontrolna –  $3,1 \cdot 10^8$  jtk/g, preparat z dodatkiem betainy –  $3,9 \cdot 10^8$  jtk/g, preparat z dodatkiem sorbitolu –  $4,3 \cdot 10^8$  jtk/g, preparat z dodatkiem betainy i sorbitolu –  $4,7 \cdot 10^8$  jtk/g, co odpowiadało przeżywalności bakterii na poziomie: 3,78, 4,75, 5,24, 5,73%.



**Rysunek 3.** Liczba bakterii w preparatach bezpośrednio po suszeniu oraz w czasie przechowywania, w zależności od dodanej substancji ochronnej  
*The number of bacteria in preparations, directly after drying during storage, depending on the added protective substance*

Na podstawie analizy uzyskanych wyników można było stwierdzić, że zarówno dodatek betainy jak i sorbitolu ma pewien wpływ na poprawę przeżywalności bakterii, szczególnie w samym procesie suszenia – w najlepszym wariacie, w którym do biomasy dodawano mieszaninę betainy z sorbitolem przeżywalność wzrosła z około 53% do ponad 86%. Natomiast poprawa przeżywalności w trakcie przechowywania, uzyskana na skutek dodatku badanych substancji ochronnych bezpośrednio do odwirowanej biomasy, była niewielka;

zarówno w wariancie kontrolnym jak i w najkorzystniejszym wariancie doświadczenia z dodatkiem substancji ochronnej przeżywalność po 12 miesiącach przechowywania obniżała się znacznie poniżej 10%.

Doświadczenia przeprowadzone we wcześniejszych etapach pracy wykazały, że stosowane dotychczas metody utrwalania biomasy pod postacią granulowanych, suszonych fluidyzacyjnie biopreparatów nie dały zadowalających wyników. Wprawdzie uzyskiwano dość dobrą przeżywalność w procesie suszenia, jednak aktywność biologiczna wytwarzanych preparatów obniżała się bardzo szybko w czasie przechowywania, co z aplikacyjnego punktu widzenia stanowiło poważny problem i obniżało atrakcyjność preparatów jako produktów handlowych. Podjęto zatem próbę modyfikacji badanego procesu wytwarzania biopreparatów, polegającą na podzieleniu procesu technologicznego na dwa etapy. W pierwszym etapie wykonywano suszony granulowany nośnik, który zawierał substancje wspomagające zarówno podjęcie procesów życiowych przez komórki bakterii w roztworach roboczych preparatów, sporządzanych przed zaaplikowaniem ich do zakiszanej paszy, jak i intensyfikujący rozwój komórek bakteryjnych w środowisku roślinnym ubogim w cukry fermentujące, w początkowym okresie zakiszania. Drugi etap procesu technologicznego stanowiło natryskiwanie biomasy na nośnik, prowadzone w złożu fluidalnym, w temperaturze 30-33°C. Takie postępowanie eliminowało negatywny wpływ stresu osmotycznego na przeżywalność bakterii. Stres osmotyczny związany był z okresowym przebywaniem komórek bakterii w środowisku częściowo upłynnionych cukrów. Wprowadzenie dwuetapowego cyklu wytwarzania biopreparatów eliminowało również ewentualne uszkodzenia ściany komórkowej mogące występować na skutek rekrytalizacji cukrów w czasie procesu dehydratacji. Wykonano posiewy preparatów bezpośrednio po suszeniu oraz po 1, 2 i 3 miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych (temperatura 8°C). Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki zamieszczono w tabeli 2.

Bezpośrednio po suszeniu liczba żywych komórek w preparatach wynosiła przeciętnie  $8,7 \cdot 10^9$  jtk./g, co odpowiadało przeżywalności bakterii na poziomie 89,5%. Po trzech miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych preparaty charakteryzowały się przeciętną liczbą komórek bakterii wynoszącą  $7,0 \cdot 10^9$  jtk./g, co odpowiadało przeżywalności średnio na poziomie 71,4%. Powyższe dane wskazują, że w ciągu trzech miesięcy przechowywania liczba komórek w preparatach obniżała się o niecałe 20 %. Natomiast w najlepszym wariancie doświadczenia dotyczącego procesu jednoetapowego (jednoczesny dodatek betainy i sorbitolu jako substancji ochronnych) liczby żywych komórek bakterii, w czasie 3 miesięcy przechowywania, obniżała się o 80,4% (rysunek 3).

**Tabela 2.** Liczba bakterii w preparatach oraz przeżywalność bakterii w procesie suszenia i przechowywania w temperaturze 8 °C (dwuetapowy cykl technologiczny)  
*The number of bacteria in preparations and the survivability of bacteria during drying process and during the storage at temperature of 8°C (two-stage technological cycle)*

L.p.	Badany parametr	Bezpośrednio po suszeniu	Po przechowywaniu przez:		
			1 miesiąc	2 miesiące	3 miesiące
1.	Liczba bakterii, jtk./g	8,7·10 <sup>9</sup>	8,2·10 <sup>9</sup>	7,8·10 <sup>9</sup>	6,2·10 <sup>9</sup>
2.		9,1·10 <sup>9</sup>	8,9·10 <sup>9</sup>	8,4·10 <sup>9</sup>	7,8·10 <sup>9</sup>
3.		8,4·10 <sup>9</sup>	8,0·10 <sup>9</sup>	7,5·10 <sup>9</sup>	6,9·10 <sup>9</sup>
średnia		8,7·10 <sup>9</sup>	8,4·10 <sup>9</sup>	7,9·10 <sup>9</sup>	7,0·10 <sup>9</sup>
1.	Przeżywalność, %	89,2	84,1	80,0	63,6
2.		93,3	91,3	86,1	80,0
3.		86,1	82,0	76,9	70,7
średnia		89,5	85,8	81,0	71,4

Równoległe z badaniami dotyczącymi przechowywania preparatów bakteryjnych w warunkach chłodniczych przechowywano te same preparaty w temperaturze pokojowej. Badania te nie dały pozytywnych wyników, tzn. przeżywalność bakterii we wszystkich badanych próbkach była bardzo niska i wynosiła średnio około 10%.

## WNIOSKI

1. Wirowanie biomasy przy współczynniku zwielokrotnienia przyspieszenia ziemskiego 13000·g nie wpływa letalnie na komórki bakterii do 270 min trwania procesu.
2. Spośród przebadanych nośników najkorzystniejsze wyniki, odniesione do przeżywalności bakterii, uzyskano w preparacie zawierającym jako nośniki skrobię rozpuszczalną, sacharozę, laktozę i glukozę, jednak przeżywalność bakterii w czasie przechowywania preparatów przez 12 miesięcy była niska – poniżej 4 %.
3. Dodatek substancji ochronnych – sorbitolu i betainy nie miał istotnego wpływu na podwyższenie przeżywalności komórek bakterii w czasie przechowywania.

4. Modyfikacja technologii, polegająca na nanoszeniu biomasy w złożu fluidalnym na gotowy, granulowany nośnik, spowodowała kilku procentowy wzrost przeżywalności w czasie dehydratacji oraz wzrost przeżywalności w czasie przechowywania przez 3 miesiące o około 60 %.

## PIŚMIENNICTWO

1. Abadias M., Teixido N., Usall J., Benabarre A., Vinas I. (2001). Viability, efficacy and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. J. Food Prot. 64, 856-861.
2. Bayrock D., Ingledew W.M. (1997). Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. Food Research Inter. 30 (6), 417-425.
3. Cardona T.D., Driscoll J.L., Paterson G.S., Szrednicki G.S., Kim W.S. (2002): Optimizing conditions for heat pump dehydration of lactic acid bacteria. Drying Technology, 20, 8, 1611-1632.
4. Champagne C.P., Gardner N., Brochu E., Beaulieu Y. (1991): The freeze-drying of lactic acid bacteria. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 24, 118-128.
5. Chmiel A. (1998): Biotechnologia – podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. Warszawa: PWN.
6. Diniz-Mendes L., Bernardes E., De Araujo P.S., Panek A.D., Paschoalin V.M.F. (1999): Preservation of frozen yeast cells by trehalose. Biotechnology and Bioengineering, 65, 572.
7. Font de Valdez G.F., de Giori G.S., de Ruiz Holgado A.P., Oliver G. (1985): Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 49, 413-415.
8. Jasiński A., Kilarski W. (1987). Ultrastruktura komórki. Warszawa: WSiP.
9. Kets E.P.W., J.A.M. de Bont (1994): Protective effect of betaine on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying. FEMS Microbiology Letters. 116, 251-256.
10. Kilara A., Shanani K.M., Das N.K. (1976): Effect of cryoprotective agents on freeze-drying and storage on lactic cultures. Cultured Dairy Products Journal, 11,8.
11. Kowalski S., Sikora M. (2004). Hydrokoloidy polisacharydowe jako substancje dodatkowe w przemyśle spożywczym. Prz. Piek. Cukier., (7), 6-8.



12. Kudra T., Strumiłło C. (1998). Thermal processing of biomaterials. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers. OPA.
13. Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H. (1995): Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3592-3597.
14. Lievens L., Riet K-van't. (1994): Convective drying of bacteria II. Factors influencing survival. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 51, 71-89.
15. Miecznikowski A., Lenart A. (2010): Wpływ składu biopreparatów na przebieg suszenia fluidyzacyjnego bakterii fermentacji mlekowej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., PAN, Warszawa*, 553, 155-169.
16. Morichi T. (1974): Preservation of lactic acid bacteria by freeze-drying. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 8, 171-176.
17. Müller G. (1990). *Podstawy mikrobiologii żywności*. Warszawa: WNT.
18. Nicklin J., Graeme-Cook K., Killington R. (2004). *Mikrobiologia*. Warszawa: PWN.
19. Powalowski Sz., Gulewicz P., Grajek W. (2002): Wpływ ciśnienia osmotycznego na stan fizjologiczny komórek. *Postępy Biologii Komórki*, 29, 435-448.
20. Rudolph A.S., Crowe J.H., Crowe L.M. (1986): Effect of three stabilizing agents – praline, betaine and trehalose – on membrane phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 245, 134-143.
21. Saleki-Gerhardt A., Stowell J.G., Byrn S.R., Zografi G. (1995). Hydration and dehydration of crystalline and amorphous of raffinose. *J. Pharm. Sci.* 84, 318-323.
22. Slade L., Levine H. (1995). Water and the glass transition – dependence of the glass transition on composition and chemical structure: special implications for flour functionality in cookie baking. *J. Food Eng.* 24, 431-509.
23. Smirnoff N., Cumbes Q.J. (1989): Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 4, 1057-1060.
24. Turker N., Hamamci H. (1998): Storage behavior of immobilized dried microorganisms. *Food Microbiol.* 15, 3-11.
25. Turkiewicz M. (2006): Drobnoustroje psychrofilne I ich biotechnologiczny potencjał. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych.* 55, 4, 307-320.
26. Tutowa E.G., Kuc P.S. (1991): *Suszenie produktów biosyntezy*. Warszawa: WNT