

BADANIA NAD WYZNACZENIEM OPTYMALNEJ TEMPERATURY SUSZENIA FLUIDYZACYJNEGO POTENCJALNIE PROBIOTYCZNYCH PREPARATÓW DROŹDŹOWYCH

Antoni Miecznikowski, Katarzyna Piasecka-Jóźwiak, Joanna Rozmierska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego,

02-532 Warszawa ul. Rakowiecka 36

antoni.miecznikowski@ibprs.pl

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu temperatury suszenia fluidyzacyjnego na aktywność biologiczną preparatów drożdżowych bezpośrednio po zakończeniu procesu suszenia i w czasie przechowywania przez 8 miesięcy.

Materiał do badań stanowiła biomasa drożdży *Candida quilliermondii* KKP 1621. Szczep ten charakteryzuje się właściwościami potencjalnie probiotycznymi.

Jako nośnik drożdży wykorzystywano rozpuszczalną skrobię ziemniaczaną, a jako emulgator stosowano lecytynę. Biopreparaty granulowano z zastosowaniem sit o rozmiarach oczek 1,5 x 1,5 mm. Preparaty suszono w suszarce fluidyzacyjnej w czterech zadanych temperaturach powietrza: 31, 35, 39 i 45°C w czasie od 60 do 35 minut. Aktywność biologiczną oznaczano bezpośrednio po suszeniu oraz po 6 i 8 miesiącach przetrzymywania w temperaturze 8-10°C.

Stwierdzono, że stosując metodą fluidyzacyjną do suszenia drożdży z gatunku *Candida quilliermondii* można zapewnić wysoką przeżywalność komórek, przy czym przeżywalność jest uzależniona od temperatury suszenia. W najkorzystniejszym wariantcie doświadczenia, to jest przy zadanej temperaturze procesu 31°C, przeżywalność komórek drożdży wynosiła 89%. Tak otrzymane preparaty, przechowywane w temperaturze 8-10 °C, traciły do 50% aktywności biologicznej po 6 miesiącach przechowywania, a po 8 miesiącach aktywność ta obniżała się do około 20%.

Słowa kluczowe: preparaty drożdżowe, suszenie fluidyzacyjne drożdży

THE RESEARCH ON THE DETERMINATION OF OPTIMAL TEMPERATURE OF THE FLUIDIZED BED DRYING PROCESS OF POTENTIALLY PROBIOTIC YEAST'S PREPARATIONS

Summary

The aim of the work was to determine the effect of fluidized bed drying temperature on biological activity of yeast preparations directly after completion of drying process and during the storage for 8 months.

The research material consisted of *Candida quilliermondii* KKP 1621 yeast biomass. The mentioned strain is characterized by potentially probiotic properties.

The soluble potato starch was employed as carrier of yeasts and lecithin was used as emulsifier. Biopreparations were granulated using mesh of size of 1.5 x 1.5 mm. The discussed preparations were dried in fluidal dryer at four set air temperatures: 31, 35, 39 and 45°C for 60 – 35 min. Biological activity was determined directly after drying and after 6 and 8 months of the storage at temperature of 8 – 10°C. It was found that drying of the yeasts from *Candida quilliermondii* species by fluidal drying method enabled obtaining preparations characterized by high survival rate of yeast's cells and the survivability is dependent on drying temperature. The survivability of yeast cells in the most favorable variant of the experiment was equal to 89%. The preparations, as obtained by the described method and stored at temperature of 8-10°C, loose up to 50% of their biological activity after 6 months of storage and after 8 months of storage, the mentioned activity fell down to ca. 20%.

Key words: yeast's preparation, fluidized bed drying of yeast

WSTĘP

Aktywność biologiczna preparatów drożdżowych suszonych konwekcyjnie zależy od wielu czynników, w tym od zastosowanej metody suszenia i parametrów prowadzenia procesu, stanu fizjologicznego komórek drożdży oraz nośników i substancji ochronnych wykorzystywanych w procesie. Przy dokonywaniu wyboru metody suszenia istotny jest również aspekt ekonomiczny, uwzględniający rzutujące na opłacalność produkcji opracowanych preparatów koszty prowadzenia procesu w skali przemysłowej.

Produkty biologiczne, jako obiekty suszenia, można klasyfikować na kilka sposobów uwzględniających różne kryteria, np.: walory użytkowe i przeznaczenie suchego produktu, właściwości mikrobiologiczne i pochodzenie bioproduktu, stopień oporności na proces

odwadniania i nagrzewania. Jednak z punktu widzenia technologii suszenia to ostatnie kryterium ma decydujące znaczenie. Według tego kryterium bioprodukty można zakwalifikować do dwóch zasadniczych grup: pierwszej – obejmującej wegetatywne formy bakterii, drożdże, wirusy, białka (ogólnie materiały termolabilne); drugiej – do której zaliczyć można formy przetrwalnikujące bakterii oraz produkty biosyntezy takie jak witaminy czy antybiotyki [Adamiec i in. 1990; Tutowa, Kuc, 1991; Witrowa-Rajchert, Samborska 2002].

Do suszenia materiałów o termostabilności wyższej od bakterii fermentacji mlekowej (preparatów enzymatycznych, aminokwasów, preparatów bakterii przetrwalnikujących) często stosowane jest suszenie rozpyłowe [Witrowa-Rajchert, Samborska 2002].

Wegetatywne formy mikroorganizmów, charakteryzują się niską termostabilnością, co przejawia się dużą szybkością obumierania komórek i utratą aktywności związanej z dehydratacją termiczną w zakresie temperatur 40-60°C [Morozow, Petin 2008]. Mechanizm śmierci komórek drobnoustrojów, podczas ich suszenia i przechowywania w stanie wysuszonym, nie jest jeszcze w pełni poznany, a prowadzone w tym zakresie badania wciąż ujawniają nowe aspekty tego zagadnienia. Wiadomo jednak, że w czasie tych procesów zmienia się skład chemiczny i grubość ściany komórkowej, następuje powolne utlenianie zawartych w niej kwasów tłuszczowych, wzrasta aktywność ATP-azy, a zatem następuje rozkład ATP. Anabioza, spowodowana odwodnieniem komórek, wywołuje w części populacji efekt letalny, którego przyczyną może być naruszenie błony komórkowej, jej destrukcja lub deformacja jak i denaturacja białka komórkowego [Bayrock, Ingledew 1997; Beney, Geravis 2001; Mille i in. 2003]. W trakcie odwadniania komórki tracą wodę wolną, aktywną biologicznie, a pozostaje w nich nieaktywna biologicznie woda związana, występująca w postaci otoczek grup polarnych substancji stanowiących szkielet żelu protoplazmy. W wodzie związanej nie rozpuszczają się substancje znajdujące się w przestrzeniach wolnych struktury żelowej, co jest jedną z przyczyn zatrzymania przemian biochemicznych. Przemiana białek protoplazmy z hydrozolu w hydrożel, postępująca w miarę odprowadzania wody z komórek, prowadzi do zahamowania ich funkcji życiowych w stopniu uzależnionym od ilości pozostałej w komórkach wody [Kudra, Strumiłło 1998]. Przyjmuje się, że minimalna aktywność wody w środowisku konieczna do rozwoju wegetatywnych komórek bakterii z rodzaju *Bacillus*, *Lactobacillus* i niektórych pleśni wynosi 0,91, a w odniesieniu do większości drożdży 0,88 [Libudzisz, Kowal 2000]. Biopreparaty wysuszone metodami konwekcyjnymi charakteryzują się aktywnością wody na znacznie niższym poziomie, co skutecznie powstrzymuje rozwój zawartych w nich drobnoustrojów.

CEL PRACY

Celem pracy było określenie wpływu temperatury suszenia fluidyzacyjnego na aktywność biologiczną preparatów drożdżowych bezpośrednio po zakończeniu procesu suszenia i w czasie przechowywania przez 8 miesięcy.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań stanowiła biomasa drożdży *Candida quilliermondii* KKP 1621, otrzymana w hodowlach prowadzonych w skali mikrotechnicznej, w fermentorach Biostat B plus. Szczep ten charakteryzuje się właściwościami potencjalnie probiotycznymi.

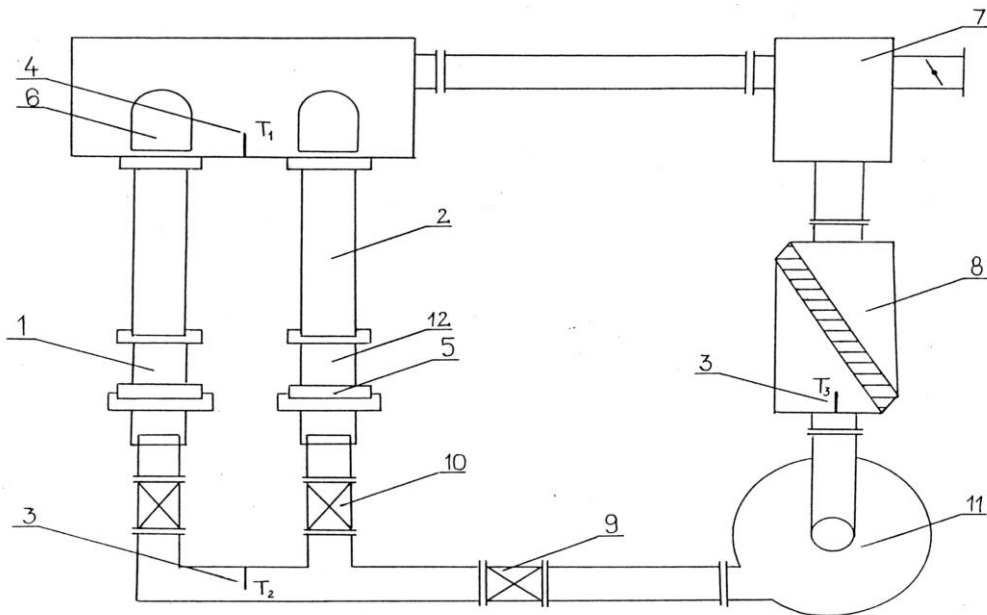
Jako nośnik drożdży wykorzystywano rozpuszczalną skrobię ziemniaczaną, charakteryzującą się właściwościami ochronnymi w stosunku do komórek drożdży oraz zapewniającą korzystne parametry reologiczne wilgotnego preparatu w trakcie procesu granulowania – odpowiednią strukturę i spoistość granul. Do preparatów dodawano emulgator – lecytynę rozpuszczalną na zimno. Proporcje składników preparatu były następujące:

- biomasa drożdży (zawartości suchej substancji 30,8%) – 140 g,
- skrobia rozpuszczalna 90 g,
- lecytyna – 1 g.

Biopreparaty otrzymywano mieszając w określonych proporcjach suche składniki, które następnie mieszano z biomasą drożdży. Preparaty granulowano przeciskając powstałą mieszaninę przez sита o rozmiarach oczek 1,5 x 1,5 mm.

Preparaty suszono przy wykorzystaniu metody fluidyzacji, eliminującej możliwość lokalnego przegrzewania materiału oraz zapewniającej jednorodność uzyskiwanego produktu.

Badania prowadzono przy wykorzystaniu laboratoryjnej suszarki fluidyzacyjnej o działaniu okresowym. Budowę stanowiska badawczego przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat stanowiska badawczego „laboratoryjna suszarka fluidyzacyjna”.

- 1 – pojemnik z sitem, 2 – komora fluidyzacyjna, 3 – regulator temperatury, 4 – pomiar temperatury, 5 – pomiar prędkości przepływu powietrza, 6 – filtr workowy,
 7 – osuszacz powietrza, 8 – nagrzewnica elektryczna, 9 – zawór główny przepływu powietrza, 10 – zawory regulacyjne przepływu powietrza, 11 – wentylator,
 12 – pomiar temperatury i wilgotności powietrza wewnątrz złoża fluidalnego

Scheme of research stand “laboratory fluidized bed dryer”

- 1 – container with the sieve; 2- fluidization chamber; 3- temperature regulators; 4 – temperature measurement; 5- measurement of air flow rate; 6 – bag filter; 7 – air drier; 8 – electric heater; 9 – main valve of air flow; 10 – regulatory valves of air flow; 11 – ventilator; 12 – measurement of temperature and air humidity inside the fluidized bed

W trakcie procesu suszenia temperatura w nagrzewnicy nastawiona była na stałą wartość, natomiast temperatura w komorze suszenia obniżała się początkowo do wartości minimalnej, a w miarę przebiegu procesu dążyła asymptotycznie do wartości zadanej. Przed przeprowadzeniem poszczególnych cykli suszenia aparat wygrzewano do osiągnięcia zadanej wartości temperatury powietrza suszącego. Przepływ powietrza regulowano tak, aby charakterystyka złoża mieściła się w obszarze fluidyzacji burzliwej, zapewniającej wysokie współczynniki wymiany ciepła i masy (oceny reżimu fluidyzacji dokonywano metodą obserwacji wizualnych). W przypadku badanych preparatów było to konieczne ze względu na tendencję do zbrylania się złoża przy zbyt małych prędkościach powietrza.

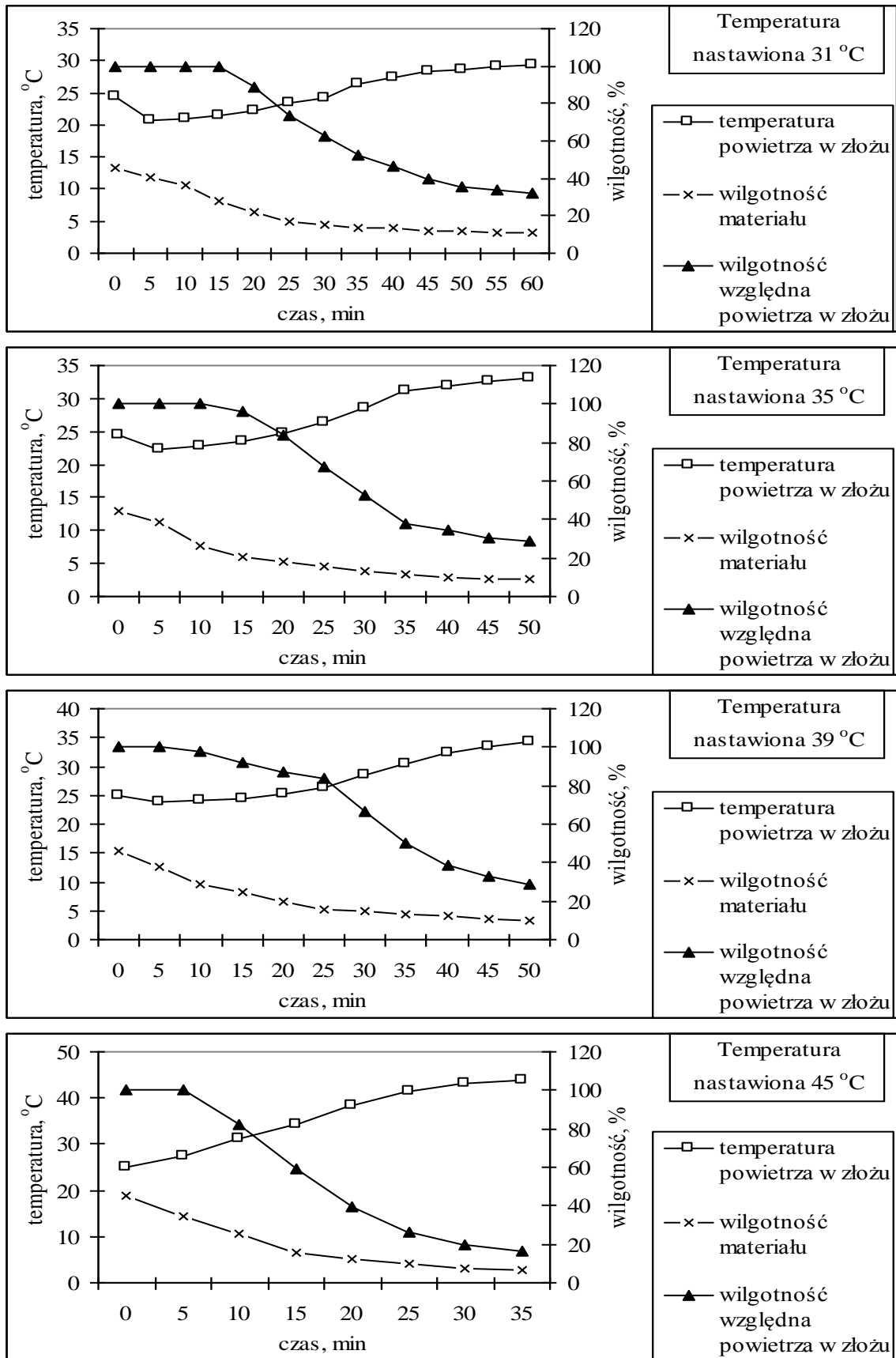
Preparaty suszono przy czterech zadanych poziomach temperatury powietrza suszącego nastawianych na regulatorach grzałek suszarni: 31, 35, 39 i 45°C. Pomiary parametrów

procesu wykonywano co 5 minut. Wszystkie wyniki są wartościami średnimi z trzech serii pomiarowych.

Liczbę drożdży w preparatach określano za pomocą posiewów (metoda płytkowa) zgodnie z normami PN-EN ISO 4833:2004, PN-ISO 6887-2000 (w podłożu YPG, hodowle inkubowano w temperaturze 30 °C przez 72 h).

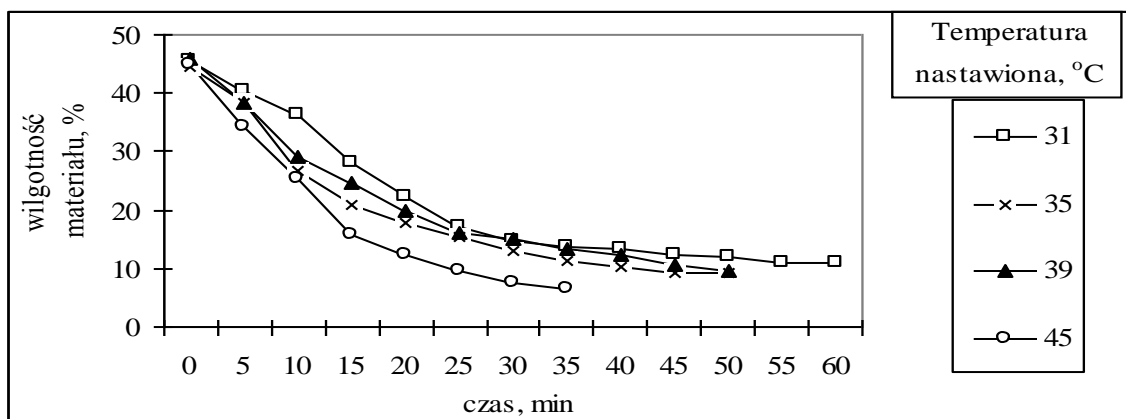
WYNIKI I DYSKUSJA

W celu kontroli rzeczywistych parametrów przebiegu procesu oprócz pomiaru zadanej temperatury powietrza suszącego na wlocie do suszarni mierzono również temperaturę i wilgotność względną powietrza wewnątrz złoża fluidalnego, co umożliwiała otrzymanie pełniejszego obrazu przebiegu procesu suszenia. Równolegle wykonywano też pomiary wilgotności suszonego granulatu. Wyniki pomiarów przeprowadzonych w trakcie doświadczeń przedstawiono na rysunek 2, w postaci krzywych zmian poszczególnych mierzonych parametrów w przypadku czterech różnych temperatur zadanych powietrza suszącego. Temperatura powietrza w złożu, w momencie rozpoczęcia pomiarów, bezpośrednio po napełnieniu zasobnika suszarki i uformowaniu się złoża, mieściła się w zakresie od 24,3 do 25,1 °C niezależnie od temperatury nastawienia regulatora. Taka wartość temperatury powietrza związana była z temperaturą granulatu (równą temperaturze otoczenia – około 24 °C), którym napełniano zasobnik suszarki, niższą od temperatury nastawienia, a także z nasyceniem powietrza wilgocią pochodzącą z preparatu – w początkowym okresie suszenia wilgotność względną powietrza wynosiła 100 %. W miarę ogrzewania złoża oraz usuwania wilgoci z granulatu, co wiązało się z wykorzystaniem znacznej ilości energii cieplnej do odparowania wilgoci, następował początkowo spadek temperatury powietrza (przy temperaturach nastawienia 31, 35 i 39°C), a następnie systematyczny wzrost do poziomu temperatury zadanej. Natomiast w przypadku temperatury nastawienia 45 °C ilość energii cieplnej zawartej w powietrzu umożliwiała szybki wzrost temperatury powietrza w złożu i dążenie do temperatury zadanej, z pominięciem etapu jej początkowego spadku. Zmianom temperatury towarzyszyły zmiany wilgotności względnej powietrza. W początkowej fazie procesu suszenia wilgotność powietrza wewnątrz złoża wynosiła 100%, z tym, że ze wzrostem zadanej temperatury powietrza suszącego czas, w którym występowało nasycenie powietrza wilgocią, malał z 15 do 5 minut. Pod koniec suszenia wilgotność względną powietrza obniżała się do wartości około 32% przy zadanej temperaturze powietrza 31°C i do około 17% przy temperaturze 45°C.



Rysunek 2. Zmiany parametrów powietrza suszącego w komorze suszarni fluidyzacyjnej
Changes of the parameters of the drying air in the chamber fluid bed dryer

Początkowa wilgotność materiału we wszystkich wariantach doświadczeń była jednakowa i wynosiła około 45,5%. Intensywność procesu oddawania wilgoci związana była z temperaturą powietrza suszącego, co zobrazowane zostało na rysunku 3, na którym przedstawiono krzywe zmian wilgotności suszonego materiału. Podwyższenie temperatury powietrza suszącego powodowało intensyfikację procesu dyfuzji wilgoci z wnętrza materiału i był to jedyny czynnik wpływający na przebieg procesu, ponieważ prędkość przepływu powietrza przez złożę, a więc także warunki przebiegu procesu wymiany masy oraz wilgotność powietrza w otoczeniu były jednakowe we wszystkich wariantach doświadczenia. Końcowa zawartość wilgoci w uzyskanych preparatach związana była z końcową temperaturą procesu suszenia i mieściła się w przedziale od 10,8% w przypadku temperatury zadanej 31°C do 6,6% przy temperaturze zadanej 45°C. Czas suszenia niezbędny do osiągnięcia podanych zawartości wilgoci w preparatach wynosił od 60 do 35 minut.



Rysunek 3. Zmiany wilgotności suszonego materiału w zależności od temperatury zadanej powietrza suszącego.
Changes in moisture content of dried material, depending on the drying air temperature setpoint

Podstawowym parametrem charakteryzującym prawidłowość przebiegu procesu suszenia jest przeżywalność komórek drożdży w trakcie samego procesu oraz aktywność biologiczna gotowego produktu w czasie przechowywania. W celu określenia przeżywalności komórek drożdży, w trakcie badań wykonywano oznaczanie liczby żywych komórek zarówno w wilgotnych preparatach bezpośrednio przed rozpoczęciem procesu suszenia jak i w preparatach wysuszonych, zaraz po zakończeniu procesu suszenia. Wyniki zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Liczba drożdży w preparatach suszonych metodą fluidyzacji

Cell number of yeast in preparations dried by fluidization (CFU/g)

Preparat	Liczba drożdży, j.t.k./g
Wilgotny przed suszeniem	$7,0 \cdot 10^9$
Wysuszony – temperatura nastawiona 31 °C	$3,8 \cdot 10^9$
Wysuszony – temperatura nastawiona 35 °C	$1,1 \cdot 10^9$
Wysuszony – temperatura nastawiona 39 °C	$8,7 \cdot 10^8$
Wysuszony – temperatura nastawiona 45 °C	$5,0 \cdot 10^8$

Stwierdzono możliwość osiągnięcia wysokiej przeżywalności drożdży badanego szczepu w procesie suszenia fluidyzacyjnego, przy czym liczba żywych komórek w preparatach zależała od końcowej temperatury suszenia, a więc warunków dehydratacji – w przebadanym zakresie temperatur ze wzrostem temperatury liczba żywych komórek znacząco malała. Przeżywalność komórek drożdży, obliczona z uwzględnieniem różnicy wilgotności preparatów suchych i mokrych, mieściła się w granicach od 89% w odniesieniu do zadanej temperatury suszenia 31°C do 12% przy zadanej temperaturze na poziomie 45°C. Preparat charakteryzujący się najwyższą liczbą żywych komórek po zakończeniu suszenia, przechowywano przez 8 miesięcy w temperaturze 8-10°C, w celu określenia utraty aktywności biologicznej. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

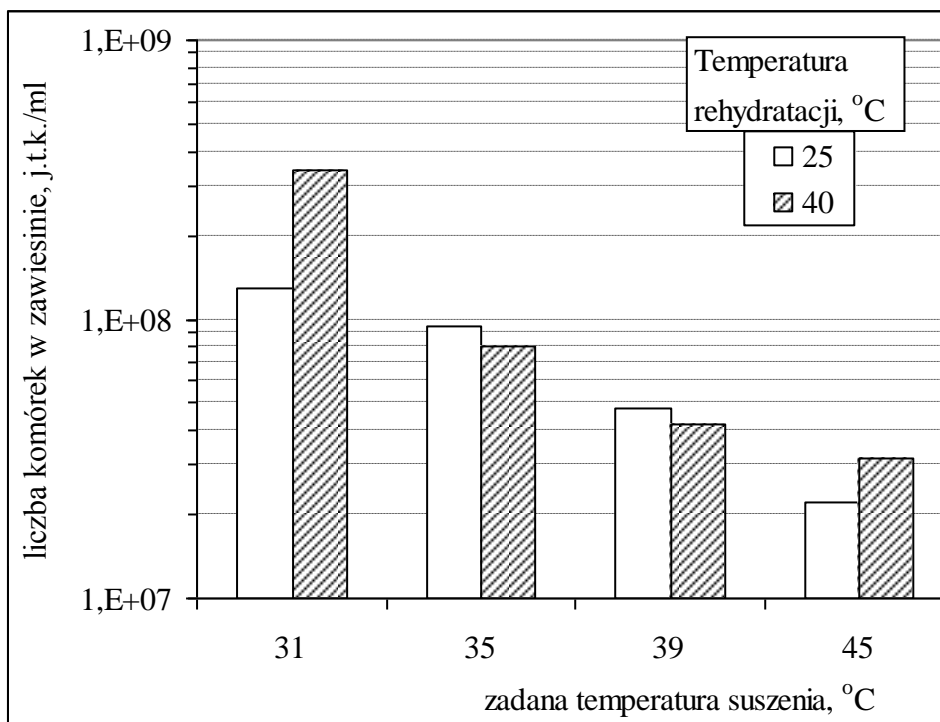
Tabela 2. Liczba drożdży w preparatach przechowywanych w temperaturze 8-10°C

Cell number of yeast in preparations stored at temperature 8-10°C

Czas przechowywania, miesiące	0	6	8
Liczba drożdży, j.t.k./g	$3,8 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^9$	$8,2 \cdot 10^8$

Stwierdzono, że w przechowywanych preparatach liczba żywych komórek drożdży znacząco malała – po 6 miesiącach przechowywania przeżywalność wynosiła 50%, natomiast po 8 miesiącach wartość tego parametru obniżała się do 22%. Jednak liczba żywych komórek drożdży pozostawała na poziomie 10^8 j.t.k./g, czyli takim jak w preparatach komercyjnych (handlowych).

W następnym etapie doświadczeń badano wpływ warunków rehydratacji na aktywność biologiczną komórek drożdży w uzyskanych roztworach wodnych. Doświadczenia prowadzono rozpuszczając preparaty, pochodzące ze wszystkich wariantów doświadczeń, w wodzie o temperaturze 25 i 40°C, w stosunku 1:20. Wyniki przedstawiono na rysunku 4.



Rysunek 4. Liczba drożdży w zawiesinie wodnej po dehydratacji prowadzonej w różnych warunkach

The number of yeast in aqueous suspension after rehydration carried out in different conditions

W przebadanym zakresie zmian parametrów procesu rehydratacji wysuszonych fluidyzacyjnie, granulowanych preparatów drożdżowych, nie stwierdzono jednoznacznej korelacji pomiędzy temperaturą rehydratacji komórek drożdży suszonych w odmiennych warunkach, a aktywnością biologiczną komórek w uzyskanych wodnych zawiesinach. W takiej sytuacji prowadzenie procesu rehydratacji powinno się odbywać w temperaturze optymalnej do namnażania komórek drożdży danego szczepu, czyli w tym przypadku 25-30°C, co umożliwi najintensywniejszy rozwój komórek po ich wystarczającym uwodnieniu.

WNIOSKI

1. Stosując do suszenia drożdży z gatunku *Candida quillermondii* metodą fluidyzacyjną można zapewnić wysoką przeżywalności komórek, przy czym przeżywalność jest uzależniona od temperatury suszenia. Najkorzystniejsze w przebadanym zakresie temperatur 31-35°C jest prowadzenie procesu suszenia w temperaturze nie przekraczającej 31°C.
2. Podwyższenie temperatury suszenia do 45°C powoduje drastyczne obniżenie przeżywalności komórek drożdży *C. quillermondii*.
3. Preparaty drożdży *C. quillermondii* KKP 1621 tracą aktywność biologiczną w czasie przechowywania w warunkach chłodniczych, jednak w ciągu 6 miesięcy przechowywania aktywność ta nie spada poniżej 50 %.
4. W zbadanym zakresie temperatur 25-40°C nie stwierdzono wpływu temperatury rehydratacji na aktywność biologiczną komórek drożdży.

PIŚMIENNICTWO

1. Adamiec J., Grabowski S., Kamiński W., Markowski A., Michałowski S., Mitura E., Strumiłło Cz., Zbiciński I. (1990): Opracowanie metod i urządzeń do suszenia produktów biosyntezy. Symposium Naukowe CPBP 04.11. nt. Doskonalenie procesów biotechnologicznych. Łódź, 13-14.12.1990. Referaty cz. II, 276-285.
2. Bayrock D., Ingledew W.M. (1997): Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. Food Res. Inter. 30, 6, 417-425.
3. Beney L., Geravis P. (2001): Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stress. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 34-42.
4. Kudra T., Strumiłło C. (1998): Thermal processing of biomaterials. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers. OPA.
5. Libudzisz Z., Kowal K. (2000): Mikrobiologia techniczna. Łódź: WPL.
6. Mille Y., Beney L., Gervais P. (2003): Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12. Biotechnol. Bioeng. 83, 578-582.
7. Morozow I.I., Petin G.V. (2008): About the characters of termoprotection in influence of osmolites on bacteria). Tsitologiya. 50, 2, 182-186.
8. Tutowa E.G., Kuc P.S. (1991): Suszenie produktów biosyntezy. Warszawa: WNT.
9. Witrowa-Rajchert D., Samborska K. (2002): Metody suszenia mikroorganizmów i produktów syntezy mikrobiologicznej. Żywn. Nauk. Technol. Jakość 2, 5-15.