

**BADANIA MIKROKAPSULKOWANIA GRANULOWANYCH  
PREPARATÓW WYBRANYCH SZCZEPÓW BAKTERII  
FERMENTACJI MLEKOWEJ Z RODZAJU *LACTOBACILLUS*  
CZEŚĆ II**

**Antoni Miecznikowski, Krystyna Zielińska**

Institut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa  
antoni.miecznikowski@ibprs.pl

**Streszczenie**

W badaniach zastosowano mieszaninę otoczkującą zapewniającą najwyższą przeżywalność bakterii w czasie przechowywania. Skład mieszaniny ustalono na podstawie badań opisanych w pierwszej części artykułu. Przeprowadzono doświadczenia, w których warstwa otoczki stanowiła od 10% do 50% masy rdzenia. Stwierdzono, że minimalna warstwa otoczki powinna stanowić 30% masy rdzenia, ponieważ poniżej tej wartości śmiertelność bakterii w czasie przechowywania była zbyt wysoka. Zastosowanie takiej warstwy otoczki spowodowało wzrost przeżywalności bakterii o 38% w czasie przechowywania w temperaturze chłodniczej. Czas mikrokapsułkowania znacząco rośnie wraz ze wzrostem warstwy otoczki i w przypadku jej masy stanowiącej 30% masy rdzenia wynosi 43 minuty, co ponad dwukrotnie wydłuża proces suszenia biopreparatów. Nie stwierdzono istotnych różnic w poprawie przeżywalności poszczególnych badanych szczepów w efekcie zastosowania procesu mikrokapsułkowania preparatów.

**Słowa kluczowe:** mikrokapsułkowanie, biopreparaty, bakterie fermentacji mlekowej

**STUDY ON MICROENCAPSULATION GRANULAR FORMULATIONS  
SELECTED STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA OF THE GENUS  
*LACTOBACILLUS*. PART 2**

**Summary**

The studies used a mixture of the encapsulating providing the highest survival of bacteria during storage. The composition of the mixture was determined on the basis of the studies described in the first part of the article. Experiments were performed in which the coating layer constituted from 10 to 50% by weight of the core. It has been found that the minimum coating layer should be 30% by weight of the core, since below this value the mortality of

bacteria during storage was too high. Use of the coating layer resulting in an increase bacterial survival by 38% during storage at refrigeration. Time microencapsulation significantly increases with increasing coating layer and when the weight of 30% by weight of the core is already 43 minutes, which more than doubles the drying process preparations. There were no significant differences in improvement of survival of each of the tested strains as a result of the application of microencapsulation formulation process.

**Key words:** microencapsulation, biopreparation, lactic acid bacteria

## **WPROWADZENIE**

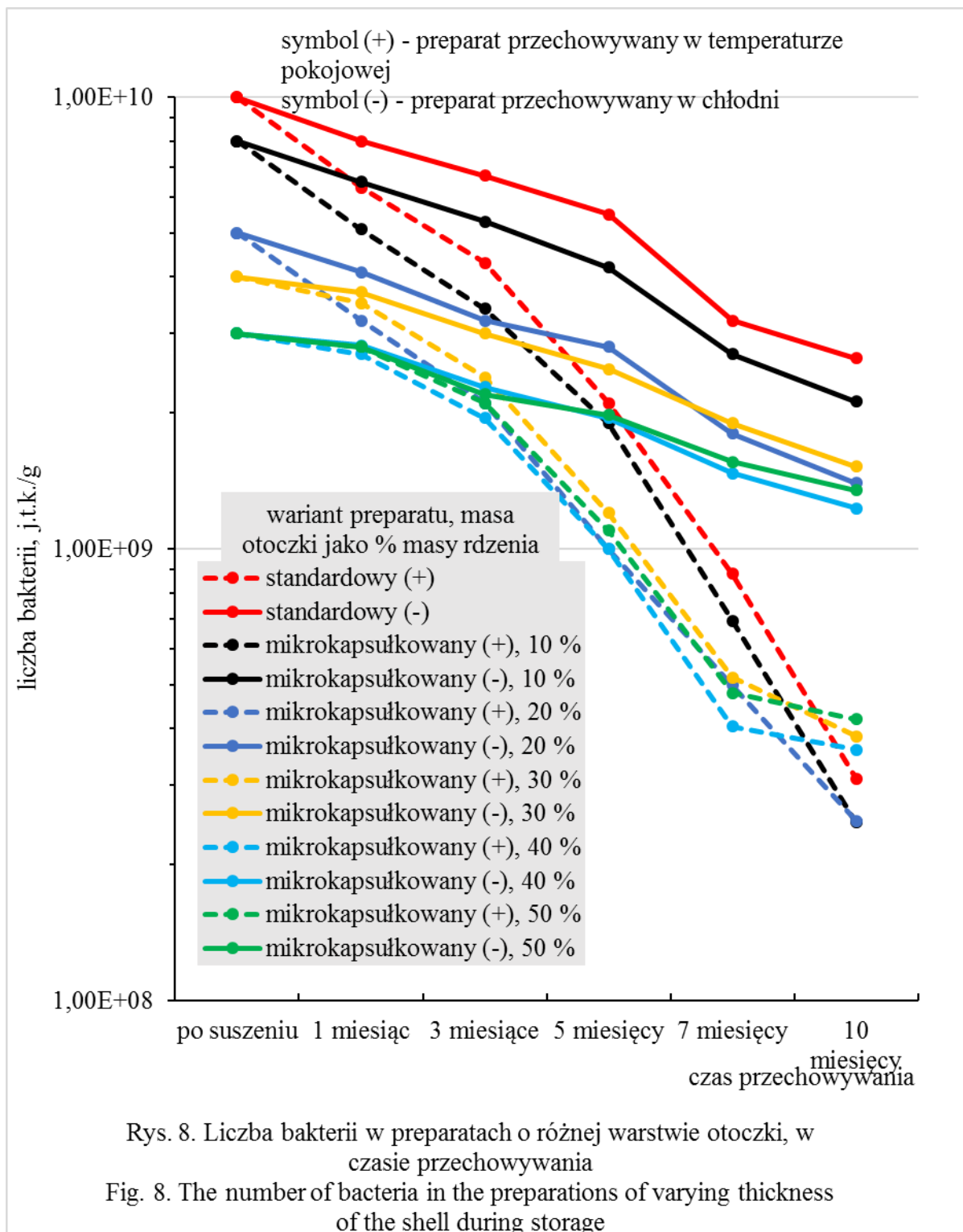
W pierwszej części artykułu opisano doświadczenia obejmujące dobór składu mieszaniny otoczkującej zapewniającej najwyższą przeżywalność bakterii w czasie przechowywania. Stosowano stały stosunek masy otoczki do masy rdzenia granulek preparatu wynoszący 30%. Materiał porównawczy stanowił preparat niekapsułkowany oznaczony jako „standardowy”. Treść drugiej części tego artykułu zawiera opis dalszych doświadczeń oraz wynikające z nich wnioski.

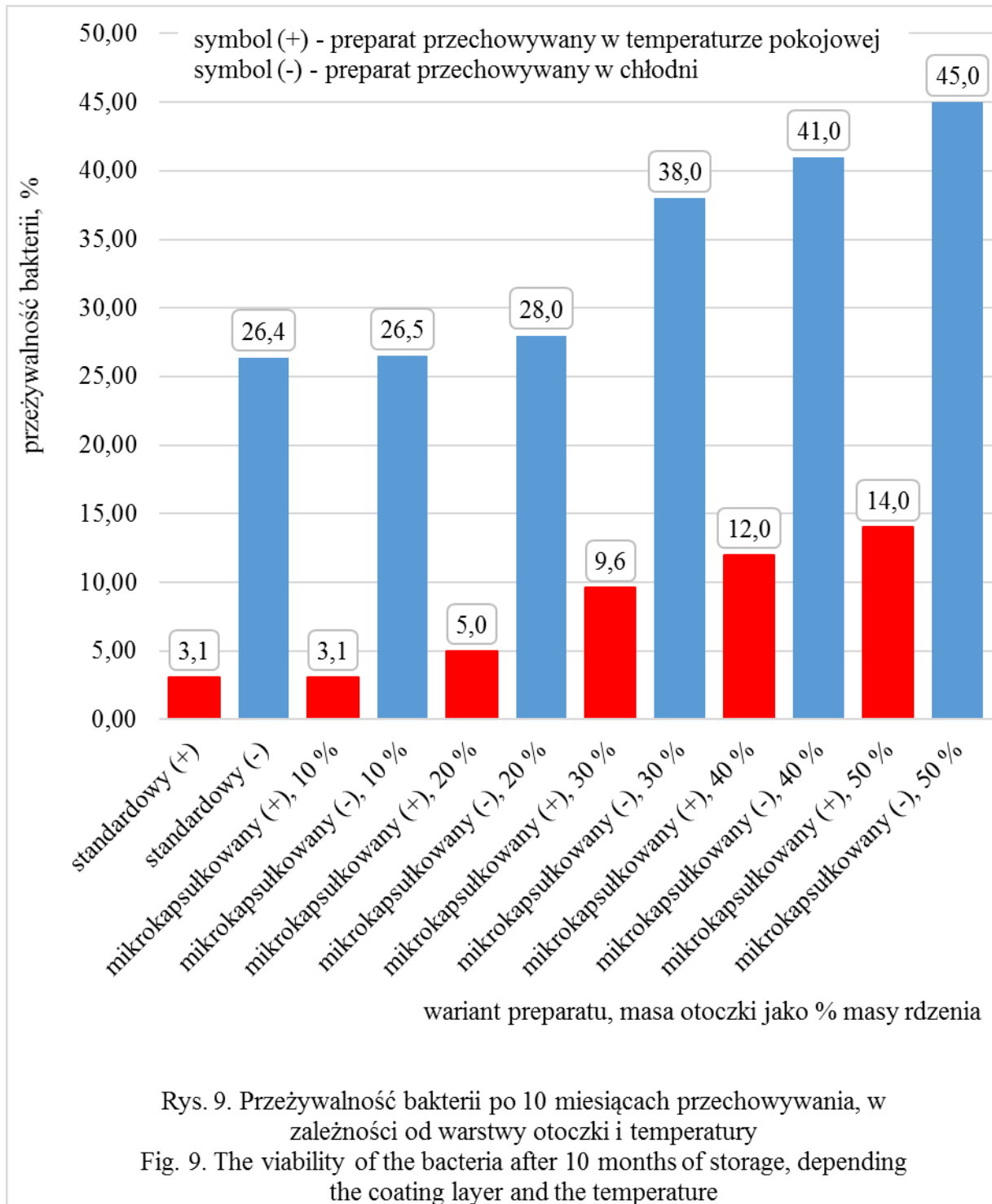
### **Badania wpływu zmian warstwy otoczki na przeżywalność bakterii w czasie przechowywania**

Po dokonaniu wyboru mieszaniny używanej w procesie kapsułkowania, charakteryzującej się najefektywniejszym działaniem ochronnym spośród przebadanych wariantów doświadczeń, przeprowadzono doświadczenia z zastosowaniem tej mieszaniny, wykonując preparaty, w których warstwa otoczki, wyrażanej stosunkiem masy otoczki do masy rdzenia, zawierała się w zakresie od 10% do 50%. Wyniki tych doświadczeń przedstawiono na rysunku 8. oraz 9. Równolegle określano też czas procesu otoczkowania w zależności od warstwy otoczki – tę zależność przedstawiono na rysunku 10.

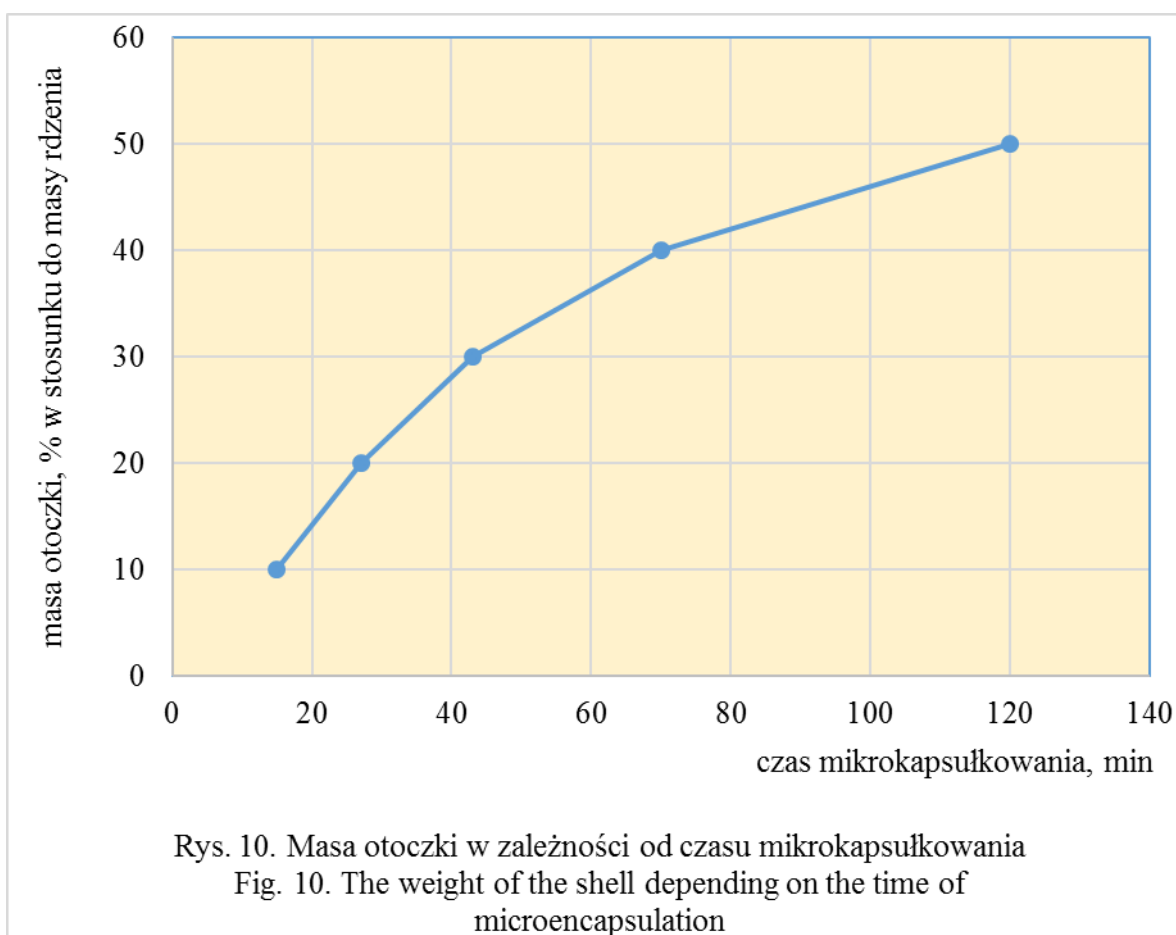
Przebieg krzywych zmian liczby bakterii w badanych preparatach (rysunek 8) wykazuje pewne różnice w skuteczności ochronnego działania warstwy otoczki, w zależności od jej masy, na żywotność bakterii, zarówno w czasie przechowywania w warunkach chłodniczych, jak i w temperaturze pokojowej. Początkowe liczby bakterii w preparatach niepoddanych procesowi kapsułkowania i kapsułkowanych różniły się między sobą, co wynika z faktu zmniejszenia średniej liczby bakterii przypadającej na jednostkę masy preparatu w efekcie tworzenia otoczki rdzenia zawierającego określoną liczbę bakterii. Okazało się, że minimalna warstwa otoczki powinna stanowić 30% masy rdzenia, ponieważ poniżej tej wartości liczba bakterii w przechowywanych preparatach obniża się istotnie szybciej niż w przypadku warstwy stanowiącej 30% masy rdzenia i więcej. Zależności te znajdują swoje odzwierciedlenie w przeżywalności bakterii (rysunek 9). Przeżywalność przechowywanych

bakterii w przypadku warstw otoczki stanowiących 10% i 20% masy rdzenia była istotnie niższa i wynosiła 26,5–28% po 10 miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych, natomiast zwiększenie tej masy do poziomu 30% spowodowało wzrost przeżywalności do 38%. Jednak dalsze zwiększanie masy otoczki nie dawało wyraźnego zwiększenia przeżywalności bakterii, szczególnie w przypadku przechowywania w warunkach chłodniczych – wzrost do 41% i 45%.





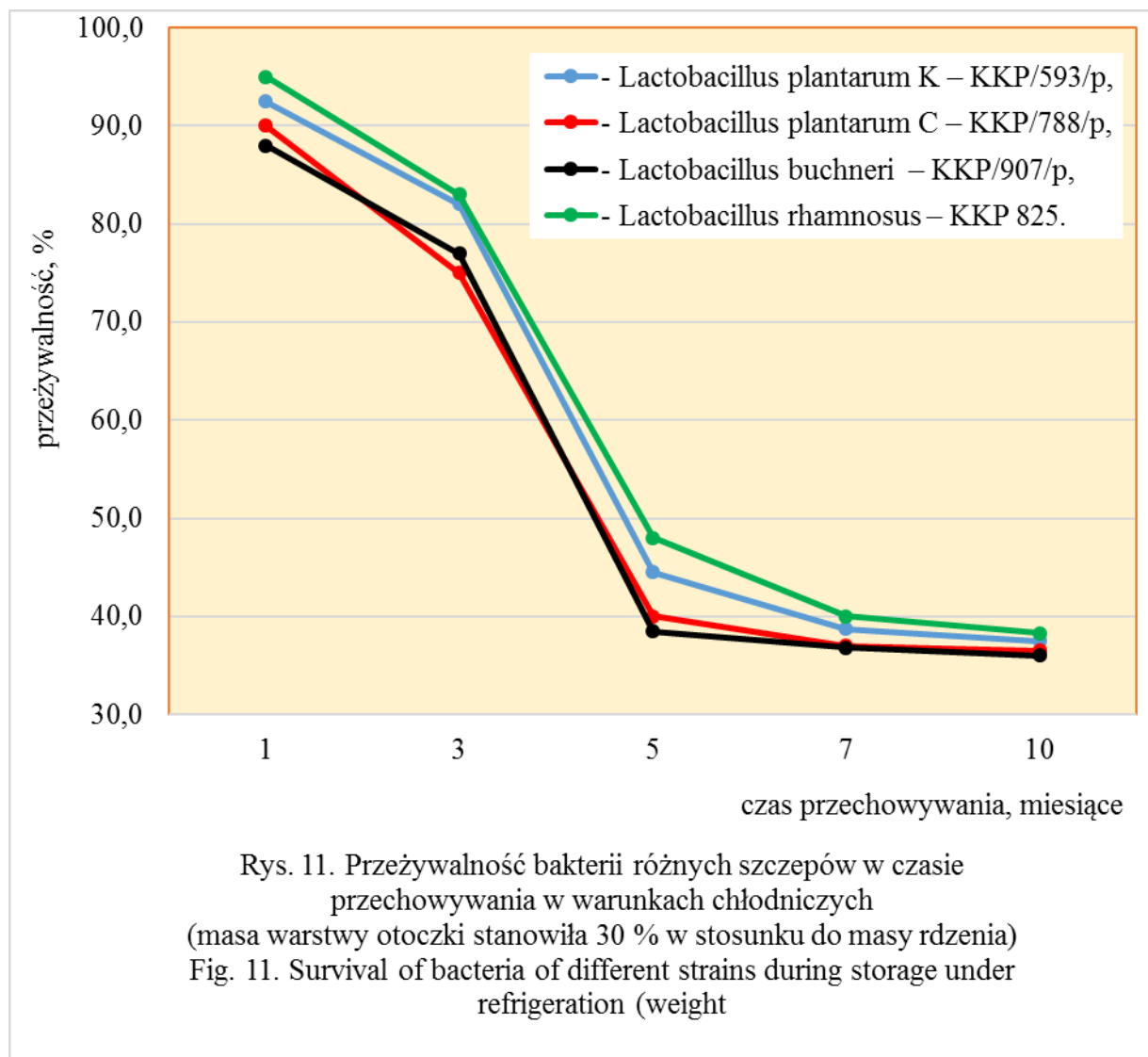
Z przedstawionej na rysunku 10. zależności wynika, że czas mikrokapsułkowania znacząco rośnie wraz ze wzrostem warstwy otoczki i w przypadku jej masy stanowiącej 30% masy rdzenia wynosi 43 minuty, a wzrost warstwy do 50% masy rdzenia powoduje wydłużenie trwania procesu mikrokapsułkowania aż do 120 minut.



Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy miały charakter aplikacyjny, ponieważ służyły poprawie aktywności biologicznej preparatów wytwarzanych w półtechnicznej linii produkcyjnej należącej do IBPRS. Proces produkcyjny prowadzony jest z wykorzystaniem suszenia fluidyzacyjnego. Czas pojedynczego cyklu takiego suszenia wynosi około 30 min, więc zastosowanie mikroksułowania z minimalną skuteczną warstwą ochronną wydłuży ten czas ponad dwukrotnie, biorąc pod uwagę jedynie sam proces technicznego nanoszenia mieszaniny ksulującej, bez uwzględniania czynności pomocniczych. Powyższe dane wskazują, że wprowadzenie do cyklu technologicznego procesu ksulowania wydłuży dwukrotnie operację suszenia preparatów, a zatem również nakłady pracy na wytworzenie określonej ilości produktu. Tak znaczne zwiększenie nakładów pracy podnosi koszty produkcji, więc jednocześnie obniża jej opłacalność, co w dużym stopniu ogranicza możliwość zastosowania opracowanego rozwiązania w procesie produkcyjnym, pomimo pewnych korzyści w zakresie poprawy jakości wytwarzanego produktu.

### Badania nad przeżywalnością bakterii wybranych szczepów w optymalnym wariacie doświadczenia

W ostatnim etapie badań przeprowadzono doświadczenia mające na celu stwierdzenie ewentualnych różnic w przeżywalności bakterii poszczególnych badanych szczepów, których preparaty mikrokapsułowano techniką uznaną za najlepszą. Badania dotyczyły wyłącznie przechowywania w warunkach chłodniczych, ponieważ we wcześniejszych etapach doświadczeń nie stwierdzono istotnego wpływu na poprawę przeżywalności podczas przechowywania biopreparatów w temperaturze pokojowej. Wyniki tych doświadczeń ilustruje wykres przedstawiony na rysunku 11.



Uzyskane wyniki wykazały nieznaczne różnice przeżywalności bakterii poszczególnych szczepów po 10 miesiącach przechowywania w temperaturze chłodniczej. Stosunkowo najlepszy wynik uzyskano w przypadku szczepu *Lactobacillus rhamnosus* – KKP 825.

Przeżywalność bakterii tego szczepu po 10 miesiącach przechowywania wynosiła 38,3%. Najniższym wskaźnikiem przeżywalności charakteryzował się szczep *Lactobacillus buchneri* – KKP/907/p, w przypadku którego wartość tego parametru wynosiła w analogicznych warunkach przechowywania 36%, jednak preparaty wszystkich szczepów charakteryzowały się wysoką aktywnością biologiczną rzędu  $10^9$  j.t.k./g.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki prowadzonych badań ukierunkowane były na poprawę stabilności biologicznej preparatów wytwarzanych w półtechnicznej linii produkcyjnej należącej do Zakładu Technologii Fermentacji IBPRS. W skład tych preparatów wchodzi kilka szczepów bakterii fermentacji mlekowej, charakteryzujących się dużą wrażliwością na warunki przechowywania, natomiast u odbiorców gotowe preparaty nie zawsze przechowywane są zgodnie z zaleceniami producenta (tzn. w warunkach chłodniczych), stąd potrzeba badań nad podwyższaniem ich trwałości. Z technicznego punktu widzenia, w przypadku wytwarzania preparatów wieloszczepowych, najkorzystniejsze jest posiadanie metody odpowiedniej do utrwalania wszystkich szczepów bakterii, co w znacznym stopniu upraszcza proces technologiczny. Mając powyższe na uwadze, prowadzono badania według schematu umożliwiającego otrzymanie jak najprostszego rozwiązania technologicznego. W praktyce oznaczało to, że w I i II etapie badań materiał badawczy stanowiła biomasa bakterii uzyskana w efekcie skojarzonych hodowli trzech szczepów: *Lactobacillus plantarum* K, *Lactobacillus plantarum* C i *Lactobacillus buchneri*, natomiast w trzecim etapie badań testowano metodę mikrokapsułkowania opracowaną przy wykorzystaniu oddzielnie hodowanych bakterii: *Lactobacillus plantarum* K, *Lactobacillus plantarum* C, *Lactobacillus buchneri* i *Lactobacillus rhamnosus*. Okazało się, że osiągnięte wyniki nieznacznie różnią się dla poszczególnych badanych szczepów bakterii. W najlepszym wariacie doświadczeń uzyskano kilkunastoprocentowy (około 12%) wzrost przeżywalności bakterii po 10 miesiącach przechowywania. Liczbowo nie jest to wartość wysoka, jednak w świetle dostępnych danych literaturowych, nielicznych i dotyczących głównie metody kapsułkowania rozpyłowego, nie należy negować znaczenia uzyskanych wyników. Przykładowo Crittenden [2005], mikrokapsułkując bakterie szczepów probiotycznych i uznając otrzymane wyniki za korzystne, uzyskiwał przeżywalność bakterii rzędu 1% do 12%, ale w stosunkowo krótkim okresie przechowywania, wynoszącym zaledwie 5 tygodni. Natomiast Goderska [2003], uznając wysoką efektywność suszenia sublimacyjnego mikrokapsułkowanych bakterii *Lactobacillus rhamnosus*, podaje, że już w trakcie prowadzonego procesu suszenia

sublimacyjnego następowało obniżenie liczby bakterii o trzy rzędy wielkości, uznawane przez autora niniejszej pracy za niedopuszczalne w aspekcie doskonalonego procesu technologicznego otrzymywania biopreparatów do kiszenia pasz i probiotycznych. Z kolei Bartkowiak [2012], prowadząc badania nad otrzymywaniem preparatów bakterii probiotycznych utrwalanych metodą suszenia rozpyłowego, otrzymywał preparaty o liczbie bakterii na dość niskim poziomie – rzędu  $10^8$  jtk/g, podkreślając, że charakteryzują się one dobrą stabilnością biologiczną w czasie przechowywania w temperaturze  $8^{\circ}\text{C}$  i niezadowalającą stabilnością w czasie przechowywania w temperaturze pokojowej.

W świetle przedstawionych powyżej przykładowych danych literaturowych uzyskane w niniejszej pracy wyniki można uznać za pozytywne, z zastrzeżeniem ograniczonego zakresu stosowania opracowanej metody do wybranych asortymentów preparatów, które ze względów aplikacyjnych muszą charakteryzować się podwyższoną opornością na zmienne warunki przechowywania.

### **WNIOSKI**

1. Przechowywanie biopreparatów w warunkach niekorzystnych (temperatura pokojowa) powoduje duży spadek ich aktywności biologicznej do poziomu zaledwie kilku procent wartości początkowej po 10 miesiącach przechowywania.
2. Mikrokapsułkowanie biopreparatów w warunkach prowadzonego eksperymentu umożliwia poprawę przeżywalności bakterii w czasie przechowywania, szczególnie w warunkach chłodniczych.
3. Efekt ochronny uzyskany w wyniku mikrokapsułkowania uzależniony jest od warstwy otoczki, a minimalna skuteczna warstwa, wyrażana stosunkiem masy otoczki do masy rdzenia, powinna wynosić 30%.
4. Wydłużenie czasu cyklu produkcyjnego w efekcie zastosowania procesu mikrokapsułkowania znacznie zwiększa nakłady pracy, a zatem prowadzi do podwyższenia kosztów wytwarzania biopreparatów.
5. Nie stwierdzono istotnych różnic w poprawie przeżywalności poszczególnych badanych szczepów w efekcie zastosowania procesu mikrokapsułkowania preparatów.



## **PIŚMIENNICTWO**

1. Anal A. K., Singh H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 240-251
2. Bartkowiak A. (2012). Prozdrowotne dodatki do żywności zawierające immobilizowane kwasy nienasycone tłuszczowe oraz bakterie probiotyczne otrzymywane metodą suszenia rozpyłowego. Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych ProBioKap, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie. Projekt wykonany w ramach priorytetu 1 – Badania i rozwój nowoczesnych technologii, poddziałania 1.3.1. [www.cbimo.zut.edu.pl](http://www.cbimo.zut.edu.pl)
3. Benita S. (1996). *Microencapsulation – Methods and Industrial Applications*. New York: Marcel Dekker Inc.
4. Chan A. W., Whitney R. A., Neufeldt R. J. (2008). Bioencapsulation of protein therapeutics within pH-responsive, semi-synthetic alginate based biomaterials for transmucosal pharmaceutical applications. XVI International Conference on Bioencapsulation, Dublin, Ireland, 4-6 September 2008, O06-2, 1-4
5. Crittenden R., Sanguansri L., Augustin M. A. (2005). Probiotic storage and delivery. PCT International Patent Application Number WO/2005/030229
6. Crittenden R., Sanguansri L., Augustyn M. A. (2006). Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during non-refrigerated storage and gastrointestinal transit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2280-2282
7. Dłużewska E. (2008). Mikrokapsułkowanie dodatków do żywności. *Przem. Spoż.*, 5, 30-35
8. Ganina B. I., Anan'eva N. V., Rozhkova T. V. (2005). Integrated approach to development of domestic direct vat starters. *Molochnaya Promyshlennost*, 11, 23-24
9. Goderska K., Zybała M., Czarnecki Z. (2003). Characterization of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* LR7 strain. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 12/53, 3, 21-24
10. Goycoolea F. M., Richardson R. K., Moris E. R., Gidley M. J. (1995). Stechiometry and conformation of xanthan in synergistic gelation with locust bean gum or konjac glucomannan: evidence for heterotypic binding. *Macromolecules*, 28, 8308-8320
11. Janiszewska E., Witrowa-Rajchert D. (2006). Mikrokapsułkowanie aromatów. *Przem. Spoż.*, 5, 40-45
12. Jankowski T. (1994). Mikrokapsułkowanie składników żywności. Szkoła Letnia „Food Product Development”, Błażejewo k/Poznania, 26-29.09.1994, 1-13

13. Kaliasapathy K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues Intestinal Microbiology*, 3, 39-48
14. Lasoń E., Ogonowski J. (2012). Kapsułkowanie – metoda immobilizacji materiałów bioaktywnych. *LABPorata.pl*, 4-5
15. Lian W-Ch., Hsiao H-Ch., Chou Ch-Ch. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *Inter. J. Food Microbiol.*, 86 (3), 293-301
16. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (2003). *Harper's illustrated biochemistry*. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill
17. Piasecka A., Goderska K. (2010). Mikroksułkowanie białek. *Biotechnologia*, 1 (88), 34-45
18. Praca zbiorowa (2001). *Technologia Żywności*. Warszawa: WSiP S.A.
19. Yu C., Han D., Wang W. (2010). Microencapsulation of Gram-negative bacteria by spray drying. *Inter. J. Food Eng.*, 6 (2), 3