

**BADANIA PRZECHOWALNICZE LIOFILIZATÓW SZCZEPÓW
BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ, STOSOWANYCH
W PRODUKCJI BIOPREPARATÓW DO KISZENIA PASZ
I PROBIOTYKÓW DLA ZWIERZĄT. CZĘŚĆ 1.**

Antoni Miecznikowski

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

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu warunków przechowywania biomasy wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na aktywność biologiczną preparatów.

Na tym etapie pracy przeprowadzono hodowle testowanych szczepów LAB (z gatunku *Lactobacillus plantarum* oraz *Lactobacillus buchneri*) w skali półtechnicznej. Otrzymaną biomasę bakterii podzielono na dwie części. Jedną suszono techniką fluidyzacji, a drugą liofilizowano. Preparaty suszone fluidyzacyjnie stanowiły materiał porównawczy. W celu sprawdzenia jakości uzyskanych biopreparatów wykonano posiewy mikrobiologiczne, po czym określono przeżywalność bakterii. Przeżywalność bakterii suszonych techniką fluidyzacji wahała się w granicach 68,9% do 76,3%, a procesu liofilizacji wynosiła od 94,7% do 99,8% w zależności od szczepu bakterii. Otrzymane preparaty stanowiły materiał do dalszych badań.

Słowa kluczowe: bakterie fermentacji mlekowej, liofilizacja bakterii, doświadczenia przechowalnicze

**STUDIES OF STORAGE FREEZE-DRIED LACTIC ACID BACTERIA STRAINS
USED IN THE PRODUCTION OF BIOPREPARATIONS TO ENSILE FEED AND
PROBIOTICS FOR ANIMALS. PART 1.**

Summary

The aim of the study was to determine the effect of storage conditions of the biomass of selected bacteria strains of the genus *Lactobacillus* on the biological activity of the preparations.

At this stage of work, lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*) were grown on a semi-technical scale. The obtained biomass of the bacteria was

divided into two parts. One was fluidized bed drying and the other lyophilized. Fluidized bed drying formulations were comparative sample. In order to check the quality of the obtained biopreparations, the number of live bacteria was determined and the survival of the bacteria was calculated. The survival of fluidized bed drying bacteria fluctuated between 68.9% and 76.3%, and the lyophilization process ranged from 94.7% to 99.8%, depending on the bacterial strain. The obtained formulations were the material for further investigation.

Key words: lactic acid bacteria, freeze-drying bacteria, storage experiments

WPROWADZENIE

W przemyśle biotechnologicznym na całym świecie mikroorganizmy odgrywają bardzo ważną rolę, wynikającą z możliwości ich szerokich zastosowań. Z punktu widzenia praktycznych zastosowań istotne jest, aby właściwości drobnoustrojów były stałe, a otrzymywane z ich udziałem produkty powtarzalne, charakteryzujące się aktywnością niezmienną w określonym czasie – np. roku. Z tego powodu biotechnolodzy prześcigają się w opracowywaniu oraz modyfikowaniu już istniejących metod skutecznego utrwalania szczepów bakterii. Pośród wielu metod zdecydowanie najbardziej skuteczną i mającą wiele zalet jest liofilizacja. W obrębie suszenia sublimacyjnego mikroorganizmów, w celu podwyższenia ich przeżywalności, powszechnie stosowany jest dodatek do biomasy odpowiednio dobranych substancji ochronnych. Poszczególne substancje mogą jednak wywierać odmienny efekt w zależności od szczepu bakterii. Nie mniej istotny jest też dobór odpowiednich warunków przechowywania, zapewniających jak najmniejszą utratę aktywności w czasie [Miyamoto i in. 2000; Porter i in. 2007].

W Zakładzie Technologii Fermentacji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waława Dąbrowskiego (ZF IBPRS) wytwarzane są biopreparaty stosowane w rolnictwie do konserwowania pasz oraz jako probiotyki dla zwierząt, a także preparaty do konserwowania surowców dla biogazowni oraz preparaty spożywcze do zakiszania warzyw i inicjowania fermentacji zakwasów piekarskich. Do niedawna w procesie technologicznym stosowana była technika fluidyzacji, charakteryzująca się wieloma korzystnymi parametrami, w tym niewielkim zużyciem energii w porównaniu z innymi technikami suszenia, np. z techniką sublimacyjną. Konkurencyjność metody suszenia fluidyzacyjnego w porównaniu z innymi metodami konwekcyjnymi polega głównie na najlepszym stosunku uzyskiwanej intensywności suszenia do kosztów przetłaczania gazu [Skoneczna, Ciesielczyk 2010].

W suszeniu fluidyzacyjnym (oprócz wibrofluidyzacyjnego) stan zawieszenia

suszonego materiału uzyskuje się w efekcie przepływu powietrza z określoną prędkością przez złożę ziarnistego materiału. Metoda ta jest szczególnie korzystna w przypadku materiałów termolabilnych, ponieważ proces przebiega w stosunkowo niskiej temperaturze, a czas jego trwania również nie jest długi. W technologii opracowanej w IBPRS preparaty otrzymywane tą metodą zachowywały dość dobrze aktywność w czasie przechowywania przez 8–10 miesięcy w warunkach chłodniczych, natomiast w temperaturze pokojowej po 10 miesiącach przechowywania ich aktywność biologiczna spadała do poziomu zbliżonego do 3%. Nie jest zadowalające z handlowego punktu widzenia, albowiem w warunkach dystrybucji preparaty te są przetrzymywane często w warunkach innych niż zalecana temperatura chłodnicza, więc tracą aktywność biologiczną w jeszcze wyższym stopniu. Potrzeba wyeliminowania tych niekorzystnych zjawisk stanowiła genezę podjęcia niniejszych badań, w ramach których poszukiwano metody zapewniającej zachowanie aktywności biologicznej preparatów również w czasie przechowywania w temperaturze pokojowej. Na podstawie analizy omówionych poniżej danych literaturowych oczekiwano, że taką metodą okaże się suszenie sublimacyjne.

Suszenie sublimacyjne jest procesem technologicznym znajdującym liczne zastosowania. Metoda ta uznawana jest za dogodną do utrwalania zarówno bakterii, drożdży, jak i zarodnikujących grzybów [Abadias i in. 2001]. Liofilizacja uważana jest za efektywną metodę utrwalania [Bednarski 1990] szczepów przemysłowych [Libudzisz i in. 2009], umożliwiającą długotrwałe ich przechowywanie, a także sposób zarówno konserwowania żywności, jak i wytwarzania żywności typu „instant” z mięsa, warzyw i owoców [Kawała i in. 1993]. Suszenie sublimacyjne jest również stosowane do utrwalania kwiatów, sypkich farmaceutyków, wyrobów medycznych, kosmetyków, środków chemicznych, barwników oraz enzymów [Liu i in. 2007].

W przypadku utrwalania bioproduktów bardzo istotne jest szybkie obniżenie zawartości wody, co skutkuje zmniejszeniem szybkości reakcji biochemicznych zachodzących w środowisku wodnym [Dziugan 2009]. Odwodnione komórki mikroorganizmów osiągają stan nazywany anabiozą. Stan ten oznacza okresowe oraz odwracalne zatrzymanie funkcji życiowych [Bednarski 2003]. W przypadku zaistnienia sprzyjających warunków funkcje życiowe mogą zostać przywrócone na normalnym poziomie. Obniżona zawartość wody w liofilizacie stanowi warunek dobrej żywotności utrwalonej kultury oraz zachowania jej cech technologicznych na wyjściowym poziomie, ochrania również substancje białkowe przed degradacją [Libudzisz i in. 2009].

W procesach biotechnologicznych prowadzonych z użyciem drobnoustrojów ważne

jest, aby procesy te były wydajne, a ich rezultaty powtarzalne. Warunki te można spełnić, zapewniając stabilność oraz czystość mikrobiologiczną szczepów przemysłowych. Idealna metoda utrwalania oraz przechowywania powinna umożliwić, przez jak najdłuższy czas, zachowanie na najwyższym poziomie wszystkich cech biologiczno-technologicznych [Chmiel 1998]. Ponadto metoda przechowalnicza powinna zapewniać maksymalną przeżywalność komórek, ograniczać liczbę komórek uszkodzonych, zapobiegać mutacjom spontanicznym i selekcji komórek mniej przydatnych w procesie technologicznym oraz minimalizować przypadkowe zanieczyszczenie innymi mikroorganizmami [Libudzisz i in. 2009]. Warto pamiętać, że ze względu na dużą różnorodność sposobów przechowywania oraz różnorodność utrwalanych materiałów nie ma jednej uniwersalnej metody, która będzie skuteczna we wszystkich przypadkach. Uzasadnione jest opracowanie metody przechowalniczej pod kątem określonego szczepu przemysłowego oraz konkretnego procesu biotechnologicznego [Bednarski 2007]. Dla cennych szczepów najbardziej pożądane są metody minimalizujące pasażowanie oraz ograniczające procesy metaboliczne. Warunki te zapewniają: zamrażanie, suszenie konwekcyjne oraz liofilizacja [Libudzisz i in. 2009].

Liofilizacja charakteryzuje się wieloma zaletami, które czynią ją niemal idealną metodą utrwalania i przygotowywania do długotrwałego przechowywania szczepów przemysłowych. Szczepy utrwalone tą metodą nawet po długoletnim przechowywaniu zachowują cechy biochemiczne, morfologiczne i immunologiczne komórek wyjściowych [Libudzisz, Kowal i in. 2009]. Wśród zalet wymienia się również zabezpieczenie przed zanieczyszczeniami oraz zakażeniami podczas przechowywania, stosunkowo dużą przeżywalność oraz łatwość dystrybucji [Abadias i in. 2001]. Ponadto utrwalone liofilizacyjnie szczepy są stabilne w temperaturze pokojowej, a ich odtworzenie jest łatwe przez dodanie odpowiedniego medium. W odniesieniu do przemysłu ważna jest też redukcja wagi gotowych produktów, możliwość łatwego zachowania sterylności oraz uzyskiwania produktów w opakowaniach jednostkowych [Ciurzyńska, Lenart 2011].

Oprócz licznych zalet liofilizacja ma również wady. Przede wszystkim jako wadę wymienia się efekt letalny tego procesu, czyli zmniejszenie przeżywalności komórek [Morgan i in. 2006]. Kolejną wadą, szczególnie istotną w przypadku stosowania tej metody na dużą skalę, jest konieczność używania specjalnej, kosztownej aparatury [Bednarski 2007] oraz duże zapotrzebowanie energetyczne. Analiza zapotrzebowania na energię wykazała, że podstawowa energia potrzebna do usunięcia 1 kg wody jest dwa razy większa w przypadku liofilizacji w porównaniu z konwencjonalnymi metodami suszenia, a prawie połowa energii przeznaczona jest na etap sublimacji [Ratti 2001]. Podczas liofilizacji bakterie poddawane są

procesowi zamrażania i suszenia, co naraża je na stres związany z wysokim stężeniem substancji rozpuszczonych, zmianami pH, niskimi temperaturami, formowaniem kryształów lodu oraz usuwaniem wody. Proces ten może powodować zniszczenie błony komórkowej, denaturację białek i DNA oraz obniżenie przeżywalności komórek [Zhao, Zhang 2005]. Dalszą konsekwencją tych czynników jest wzrost wrażliwości na kontakt z powietrzem oraz zmniejszenie zdolności do reprodukcji [De Giulio i in. 2005]. Dodatkowo istnieją doniesienia o przypadkach mutacji drobnoustrojów zabezpieczanych tą metodą, co budzi zastrzeżenia i deprecjonuje skuteczność liofilizacji [Bednarski 2003].

Przeżywalność komórek bakterii poddanych liofilizacji zależy od wielu czynników, między innymi mają na nią wpływ: substancje ochronne, początkowa liczebność komórek, stan fizjologiczny bakterii, temperatura oraz czas zamrażania, parametry procesu liofilizacji, warunki rehydratacji [Schoug i in. 2006], wiek hodowli oraz szczep bakterii [Bâati i in. 2000]. Uznaje się, że większą przeżywalność można uzyskać, stosując zawiesinę komórek o dużej gęstości pobraną z wczesnej fazy stacjonarnej [Libudzisz i in. 2009]. Poza wczesną fazą stacjonarną wzrostu mikroorganizmów również późna faza logarytmiczna jest powszechnie stosowana w przypadku liofilizacji. Generalnie uznaje się, że młode kultury bakterii są bardziej wrażliwe na suszenie sublimacyjne niż kultury pobrane z fazy późnej logarytmicznej czy stacjonarnej [Saarela i in. 2005]. Zaobserwowano również, że na przeżywalność suszenia sublimacyjnego ma wpływ rozmiar komórek: enterokoki są bardziej odporne niż większe pałeczki. Dodatkowo bakterie Gram-dodatnie są bardziej odporne niż bakterie Gram-ujemne [Carvalho i in. 2004]. Na etapie przechowywania natomiast bardzo ważna jest aktywność wody, bowiem wraz z wzrostem a_w zwiększa się liczba uszkodzonych komórek [Passot i in. 2012].

Jednym z krytycznych parametrów liofilizacji jest temperatura zamrażania (szybkość chłodzenia). Jeśli chłodzenie jest powolne, woda ma czas by wypłynąć z komórki w procesie osmozy i kryształy lodu formują się zewnątrzkomórkowo. W miarę powstawania kryształów woda jest usuwana ze środowiska pozakomórkowego, wzrasta stężenie substancji rozpuszczonych i w rezultacie występuje brak równowagi osmotycznej [Zhao, Zhang 2005]. Natomiast podczas szybkiego chłodzenia można uniknąć wzrostu stężenia substancji rozpuszczonych oraz nadmiernego uszkodzenia komórek [Meng i in. 2008].

Liofilizacja, jako bardzo złożony proces, wiąże się z wieloma zagrożeniami dla suszonych bioproduktów. Badacze podają, że poprawę przeżywalności oraz zachowanie aktywności można uzyskać, wpływając na parametry procesu lub przez modyfikacje chemiczne bądź fizyczne komórek przed procesem [Kanmani i in. 2011]. Z tego względu

prorowadzone są liczne badania nad możliwością zminimalizowania niekorzystnych efektów. Jednym z proponowanych rozwiązań jest poddawanie bakterii, podczas lub po hodowli, stresowi osmotycznemu. Dzięki temu zabiegowi następuje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia kompatybilnych substancji rozpuszczonych (osmoprotektantów – substancji, które zapobiegając utracie wody z komórki, jednocześnie nie wpływają na metabolizm mikroorganizmu nawet przy wysokim stężeniu w cytoplazmie), które zapewniają większą oporność na suszenie. Poszczególne gatunki bakterii fermentacji mlekowej mogą gromadzić różne substancje, takie jak betaina, karnityna lub asparaginian [Bergenholtz i in. 2012]. Kompatybilne substancje rozpuszczone to małe organiczne cząsteczki, które mają wiele istotnych cech, m.in. są rozpuszczalne i mogą być akumulowane, na wysokim poziomie, w cytoplazmie komórek narażonych na stres. Cząsteczki te są przeważnie obojętne chemicznie, a specyficzny system transportu dostępny w błonie cytoplazmatycznej umożliwia ich kontrolowaną akumulację [Carvalho i in. 2004]. Badacze tego zjawiska nie są zgodni co do jego znaczenia. Istnieją doniesienia, że może ono mieć negatywny wpływ na błony komórkowe, a jego skuteczność jest kwestionowana. Inni badacze uważają, że kumulowanie substancji jest naturalnym krokiem przy produkcji kultur starterowych, czyniącym je bardziej odpornymi na przetwarzanie przemysłowe [Bergenholtz i in. 2012]. W niektórych doniesieniach zwracano uwagę na wpływ składu podłoża hodowlanego na przeżywalność drobnoustrojów w procesie suszenia sublimacyjnego. Przykładowo w badaniach obejmujących testowanie przydatności podłoży serwatkowych i słodowych, różniących się zawartością cukrów, związków mineralnych oraz czynników wzrostowych, do hodowli 5 szczepów drożdży serwarskich [Połomska i in. 2007] stwierdzono wpływ składu tych podłoży zarówno na dynamikę przyrostu biomasy, jak i na przeżywalność w procesie liofilizacji, jednak związana była ona również z badanym szczepem. Generalnie w przypadku 4 z 5 badanych szczepów podłoże słodowe miało korzystniejszy wpływ na przeżywalność drożdży w procesie dehydracji.

Najskuteczniejszą i najczęściej stosowaną metodą zabezpieczania bakterii w procesie liofilizacji jest dodatek substancji ochronnych do zamrażanej suspensji [Bednarski 2003]. Podczas procesu liofilizacji dodawane substancje, poza regulacją osmotyczną, muszą również ochraniać błonę komórkową oraz składniki komórki przed zamrażaniem, odwodnieniem i wysoką temperaturą [Santivarangkna i in. 2008]. Do środków ochronnych stosowanych przy suszeniu sublimacyjnym zalicza się: adonitol, betaninę, glicerol, laktozę, odtłuszczone mleko, dimetylosulfotlenek [Zayed, Roos 2004], żelatynę, gumę ksantanową, maltodekstrynę [Champagne i in. 1996], trehalozę, białko serwatkowe, sacharozę, dekstran, glikol

polietylenowy [Meng i in. 2008]. Uznaje się, że skuteczna substancja ochronna powinna chronić komórki podczas mrożenia, łatwo ulegać suszeniu oraz tworzyć stelaż zapewniający stabilność i łatwość rehydratacji [Zhao, Zhang 2005]. Substancje ochronne można klasyfikować według różnych kryteriów. Pierwsze kryterium wynika z masy cząsteczkowej – cząsteczki o wysokiej bądź niskiej masie cząsteczkowej. Bardziej tradycyjny podział związany jest z czasem wnikania do komórki, tzn. na substancje szybko wnikające (metanol, etanol, glikol etylenowy, glikol propylenowy, dimetylosulfotlenek (DMSO) oraz wnikające wolniej (glicerol). Dodatkowo wyróżnia się podział na substancje przenikające tylko ścianę komórkową (mono- i disacharydy, aminokwasy, polimery o małej masie cząsteczkowej); przenikające jednocześnie ścianę komórkową i błonę komórkową (glicerol, DMSO) oraz nieprzenikające ani ściany komórkowej, ani błony komórkowej (polimery o wysokiej masie cząsteczkowej – białka, polisacharydy) [Hubálek 2003]. Natomiast Morgan z współpracownikami dzieli substancje ochronne na dwie główne kategorie: amorficzne formujące stan szklisty oraz eutektyczne krystalizujące sole [Morgan i in. 2006].

W zależności od właściwości substancji aktywnej inny jest mechanizm działania ochronnego, np. związki przenikające zarówno błonę, jak i ścianę komórkową sprawiają, że błona komórkowa staje się bardziej elastyczna oraz wiąże wodę, co chroni przed nadmiernym odwodnieniem, redukuje toksyczne działanie soli oraz zapobiega tworzeniu się kryształów lodu wewnątrz komórek. Związki przenikające tylko ścianę komórkową indukują plazmolizę komórek przed zamrażaniem, gromadząc się między ścianą komórkową a błoną komórkową, działają jak warstwa buforowa przeciwko powstawaniu kryształów lodu – w ten sposób zapewniają mechaniczną ochronę błony. Z kolei związki nieprzenikające ani ściany, ani błony komórkowej są adsorbowane na powierzchni mikroorganizmów, gdzie tworzą lepłą warstwę. W ten sposób hamują wzrost kryształów lodu przez zwiększanie lepkości roztworu oraz zachowywanie amorficznej struktury kryształów w bliskim sąsiedztwie komórek [Carvalho i in. 2004].

Wpływ poszczególnych czynników fizycznych na przeżywalność mikroorganizmów nie jest jednoznaczny. Naukowcy są zgodni jedynie, że dodatek substancji ochronnych poprawia zachowawczość procesu oraz zwiększa przeżywalność mikroorganizmów. Uznaje się, że substancje ochronne przeciwdziałają mechanizmom inaktywującym komórki, mianowicie: zwiększaniu stężenia elektrolitów oraz krystalizacji lodu w ich wnętrzu [Bednarski 2003].

Wszystkie opisane wyżej czynniki mające wpływ na przeżywalność w procesie liofilizacji mogą również rzutować na przeżywalność w czasie przechowywania kultur

utrwalonych sublimacyjnie. Wpływ na efekt letalny w czasie przechowywania może mieć nawet sucha masa biomasy poddanej liofilizacji. Bozoğlu i współpracownicy wykazali, że wraz ze wzrostem gęstości suspensji poddawanej dehydratacji rośnie przeżywalność komórek bakterii fermentacji mlekowej. Przeżywalność mikroorganizmów w okresie przechowywania po liofilizacji była zwiększona przez obecność martwych mikroorganizmów, które zmniejszały powierzchnię międzyfazową między żywymi komórkami i środowiskiem zewnętrznym. Wynikiem tej pracy jest też obserwacja, że *Streptococcus thermophilus* jest gatunkiem bardziej odpornym na suszenie sublimacyjne niż *Lactobacillus bulgaricus*. Stwierdzono też, że przechowywanie w próżni lub w atmosferze azotu dawało lepsze efekty niż przechowywanie w powietrzu. Słabe wskaźniki przeżywalności w powietrzu przypisano procesom dyfuzji tlenu do komórek przez wysuszoną powierzchnię międzyfazową [Bozoğlu i in. 1987].

Miyamoto przebadiał 10 gatunków mikroorganizmów: drożdży i bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich poddanych liofilizacji i przechowywanych następnie przez 10 lat w warunkach próżni w temperaturze 5°C. Stwierdził znaczne różnice w przeżywalności, zarówno w czasie procesu liofilizacji (od 10% do 80%), jak i przechowywania (od 10% do niemal 100%) [Miyamoto i in. 2000].

Porter i wsp. przeprowadzili obszerne badania dotyczące wpływu na przeżywalność bakterii z gatunku *Campylobacter jejuni* takich czynników jak: wiek kultury hodowlanej, zastosowane krioprotektanty, warunki przechowywania i warunki rehydratacji. Stwierdzono, że najlepsze efekty występują w przypadku poddawania suszeniu kultury młodej – jednodniowej; za najskuteczniejszy krioprotektant spośród przebadanych uznano trehalozę; zarówno w temperaturze chłodniczej (4°C), jak i pokojowej (25°C), *C. jejuni* przeżywały lepiej w przypadku przechowywania w próżni niż w atmosferze azotu, który z kolei dawał lepsze efekty niż przechowywanie w powietrzu. Po przechowywaniu przez miesiąc w temperaturze 4°C i 25°C zaobserwowano niewielkie różnice pomiędzy przechowywaniem w różnych atmosferach, jednak po 2 i 3 miesiącach przechowywania różnice stawały się większe. Na przykład różnica pomiędzy przeżywalnością mikroorganizmów w obecności powietrza i w atmosferze próżni w temperaturze 25°C w ciągu 3 miesięcy wynosiła 1 rząd wielkości, natomiast podczas przechowywania w temperaturze 4°C przez 3 miesiące różnice nie były znaczące [Porter i in. 2007]. W dostępnych danych literaturowych nie znaleziono wyników badań dotyczących bezpośredniego wpływu zastosowanych rodzajów opakowań na aktywność biologiczną preparatów bakterii, jednak istnieją dane dotyczące atmosfery, w jakiej przechowuje się bakterie [Porter i in. 2007]. Dane takie można powiązać w sposób

pośredni z zastosowanymi opakowaniami, gdyż np. do przechowywania w atmosferze próżni konieczne jest zastosowanie opakowań całkowicie szczelnych, takich jak woreczki barierowe, a nie nadają się do tego polietylenowe słoiczki z zatrzaskanymi wieczkami.

Konieczne było zatem przeprowadzenie badań umożliwiających wystarczająco dokładne określenie trwałości przechowalniczej preparatów bakteryjnych otrzymywanych w ZF IBPRS.

CEL I ZAKRES PRACY

Celem pracy było określenie wpływu warunków przechowywania zliofilizowanej biomasy wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na aktywność biologiczną preparatów.

Zakres pracy obejmował:

- równoległe wytworzenie w skali półprzemysłowej partii liofilizowanych oraz utrwalanych techniką fluidyzacji (jako materiał porównawczy) preparatów trzech szczepów bakterii (z gatunku *Lactobacillus plantarum* oraz *Lactobacillus buchneri*) do badań zmian aktywności biologicznej w czasie przechowywania w różnych warunkach i opakowaniach,
- doświadczenia przechowalnicze (badanie zmian aktywności biologicznej w czasie 12 miesięcy przechowywania preparatów),
- porównanie wyników badań preparatów otrzymanych testowaną metodą utrwalania bakterii (liofilizacja) oraz metodą odniesienia (suszenie fluidyzacyjne),
- dobór optymalnych warunków przechowywania biopreparatów otrzymywanych opracowaną wcześniej metodą liofilizacji.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badane mikroorganizmy

- *Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p – szczep bakterii otrzymany metodą selekcji w Zakładzie Technologii Fermentacji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, charakteryzujący się zdolnością syntetyzowania zewnątrzkomórkowych enzymów amylolitycznych oraz silnym zakwaszaniem środowiska. Stosowany jest jako podstawowy składnik biologiczny preparatów stymulujących proces kiszzenia pasz, zwłaszcza zawierających węglowodany skrobiowe. Preparaty komponowane z zastosowaniem tego szczepu umożliwiają wykonywanie kiszzonek paszowych z takich roślin jak: trawy, lucerna, koniczyna, kukurydza (ziarno i całe rośliny), inne zboża, surowe ziemniaki oraz produktów odpadowych przemysłu rolno-spożywczego, takich jak: wysłodki buraczane i wywar

gorzelniczy. Szczep *Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p charakteryzuje się również właściwościami probiotycznymi. W wyniku badań dotyczących antybakteryjnych właściwości tego szczepu (warunki mikroareobowe) stwierdzono, że wykazuje on zdolności do hamowania rozwoju bakterii chorobotwórczych, izolowanych z przewodu pokarmowego chorych zwierząt.

- *Lactobacillus buchneri* A KKP 2047p – szczep bakterii otrzymany metodą selekcji w Zakładzie Technologii Fermentacji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego charakteryzujący się zdolnością do syntezy 1,2-propanodiolu i niespotykanej dla tego gatunku bakterii zdolności do jego metabolizowania i syntezy kwasu propionowego. Jest to heterofermentatywny szczep bakterii szczególnie predystynowany do sporządzania kiszonek przeznaczonych dla biogazowni.

- *Lactobacillus plantarum* C KKP 788/p – szczep bakterii otrzymany metodą selekcji w Zakładzie Technologii Fermentacji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego charakteryzujący się zdolnością do syntetyzowania enzymów: α -amylazy, ksylanazy i endo-1,4-betaglukanazy. Preparaty komponowane z zastosowaniem tego szczepu umożliwiają wykonywanie kiszonek paszowych z takich roślin jak: trawy, lucerna, koniczyna, kukurydza (ziarno i całe rośliny), inne zboża oraz produktów odpadowych przemysłu rolno-spożywczego, takich jak: wysłodki buraczane i wywar gorzelniczy.

Stosowany nośnik

Mleko w proszku granulowane odtłuszczone (SM Gostyń, Polska).

Stosowana substancja ochronna

Glicerol (POCH, Polska).

Otrzymywanie materiału do badań

Hodowle bakterii prowadzono w fermentorach New Brunswick, o całkowitej pojemności 150 l i 1500 l, przez 24 h w temperaturze 35°C i przy pH 5,8 (regulowane przy użyciu wody amoniakalnej 12,5%).

Namnożoną biomasę oddzielano od płynu pochodzącego przy użyciu wirówki firmy Ceba Z 101 o działaniu półciągłym, przy prędkości 14 000 obrotów/min.

Liofilizacja próbek

Dehydratacja metodą sublimacyjną (Biowet, Puławy) – liofilizator półtechniczny, w komorze krystalizatora o temperaturze roboczej -55°C, przez około 48 godzin.

Doświadczenia prowadzono z wykorzystaniem liofilizatora, w którym możliwe jest przeprowadzenie wszystkich trzech etapów procesu suszenia sublimacyjnego: zamrażania,

głównego suszenia oraz dosuszenia; na dowolnym etapie procesu można kontrolować temperaturę produktu, temperaturę kondensatora lodu oraz wartość ciśnienia. Końcowa wilgotność preparatów 2–3%.

Suszenie fluidyzacyjne

Dehydratacja metodą fluidyzacji – preparaty doświadczalne wykonywano, nanosząc biomasę bakterii na granulowane nośniki w trakcie suszenia w złożu fluidalnym, w temperaturze nieprzekraczającej 35°C. Parametry procesu suszenia: wilgotność względna powietrza 30–35% (powietrze osuszane przy zastosowaniu osuszacza), temperatura powietrza wewnątrz złoża fluidalnego – zmiany narastające od wartości początkowej 26–28°C do końcowej 33–34°C, prędkość liniowa powietrza suszącego od 1,5 do 3 m/s w zależności od wysokości złoża (pomiar w pustym aparacie), wilgotność końcowa preparatów po wysuszeniu od 4,5% do 5,5%, czas suszenia 30–35 min.

Metody mikrobiologiczne

Oznaczenie liczby bakterii fermentacji mlekowej (LAB) metodą płytkową na podłożu MRS według normy (PN-EN 15787:2009).

Układ doświadczeń

Biomasy uzyskane z hodowli trzech testowanych szczepów podzielono na dwie części: jedną suszono fluidyzacyjnie (materiał porównawczy uzyskiwany metodą dotychczas stosowaną w ZTF IBPRS do wytwarzania biopreparatów), a drugą poddawano dehydratacji sublimacyjnej. Następnie wysuszone preparaty pakowano próżniowo w barierowe woreczki foliowe PA/PE lub słoiczki polietylenowe zaopatrzone w pochłaniacze wilgoci (przechowywanie w atmosferze powietrza). Próbkę ze wszystkich wariantów przechowywano równolegle w warunkach chłodniczych (10–12°C) lub temperaturze pokojowej (około 25°C). Zastosowanie określonych opakowań wiązało się z testowaniem różnych warunków przechowywania, ponieważ do przechowywania w atmosferze próżni konieczne jest zastosowanie opakowań całkowicie szczelnych, jakimi są woreczki barierowe.

Szczegółowy schemat doświadczenia przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Schemat doświadczenia przechowalniczego

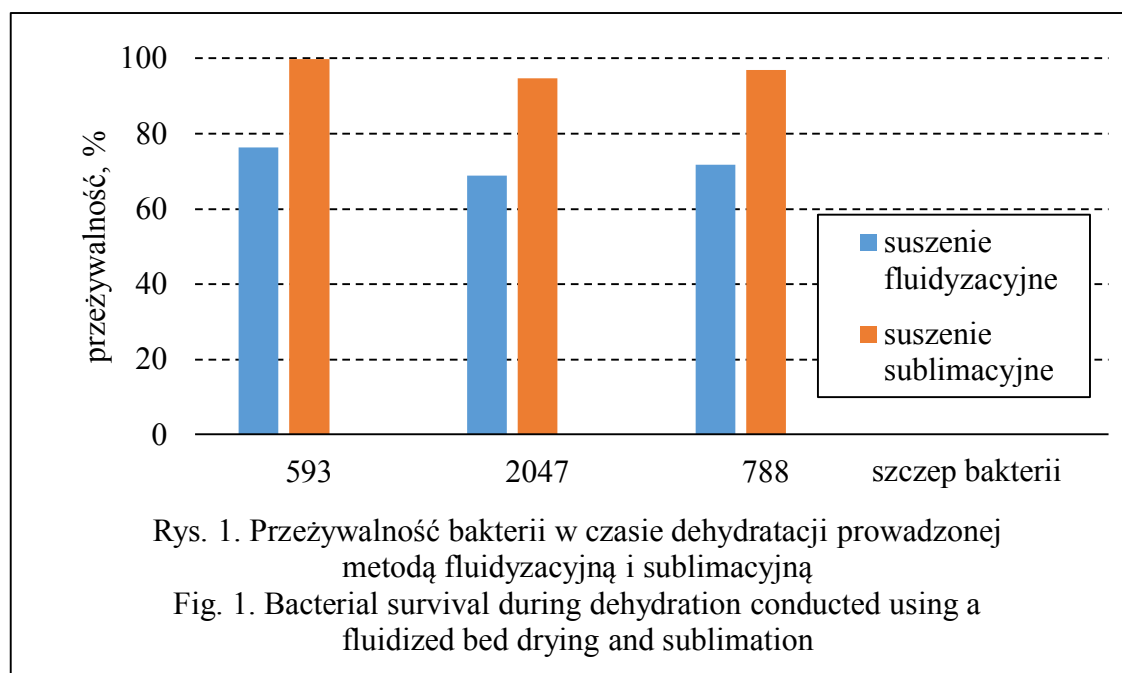
Schematic of storage experiments

Szczep bakterii	Temperatura przechowywania	Suszenie fluidyzacyjne		Liofilizacja	
		buteleczki	saszetki	buteleczki	saszetki
„593”	pokojowa	X	X	X	X
	chłodnicza	X	X	X	X
„2047”	pokojowa	X	X	X	X
	chłodnicza	X	X	X	X
„788”	pokojowa	X	X	X	X
	chłodnicza	X	X	X	X

Czas przechowywania próbek wynosił 12 miesięcy.

WYNIKI

Materiał biologiczny (biomasę bakterii), uzyskany w efekcie hodowli prowadzonych w skali półtechnicznej, utrwalano opisanymi wcześniej metodami. W celu sprawdzenia jakości uzyskanych biopreparatów wykonano posiewy mikrobiologiczne, po czym określono przeżywalność bakterii, a uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 1.



Przeżywalność bakterii suszonych techniką fluidyzacji wahała się w granicach 68,9% do 76,3%, natomiast przeżywalność procesu liofilizacji mieściła się w granicach od 94,7% do 99,8%, w zależności od szczepu bakterii.

PODSUMOWANIE

W tej części artykułu przedstawiono wyniki dotyczące etapu badań polegającego na otrzymaniu materiału badawczego, który następnie został użyty w doświadczeniach przechowalniczych, trwających 12 miesięcy. Stwierdzone różnice w przeżywalności bakterii były rzędu kilku procent (max. około 6%), więc uznano, że uzyskane biopreparaty stanowią dobry materiał do dalszych badań. Zgodnie z oczekiwaniami przeżywalność procesu liofilizacji bakterii wszystkich badanych szczepów była wyższa od wartości tego parametru uzyskiwanej w przypadku suszenia fluidyzacyjnego.

Wyniki obejmujące doświadczenia przechowalnicze przedstawiono w drugiej części artykułu.

Wykaz pozycji literaturowych w części 2 artykułu.