

BADANIA PRZECHOWALNICZE LIOFILIZATÓW SZCZEPÓW BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ STOSOWANYCH W PRODUKCJI BIOPREPARATÓW DO KISZENIA PASZ I PROBIOTYKÓW DLA ZWIERZĄT. CZĘŚĆ 2.

Antoni Miecznikowski

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

Streszczenie

Doświadczenia przechowalnicze trwały 12 miesięcy. Po 12 miesiącach prowadzenia eksperymentu wystąpiły znaczne różnice w przebiegu krzywych przeżywalności. Dotyczy to zarówno testowanych szczepów, jak i metod ich utrwalania oraz warunków przechowywania. Niezależnie od szczepu i zastosowanej metody przechowywania, preparaty wykonane z zastosowaniem suszenia fluidyzacyjnego charakteryzują się niższą przeżywalnością bakterii w porównaniu z preparatami uzyskanymi poprzez liofilizację. Przeżywalność bakterii w liofilizatach wynosiła od 17,9% do 92,0% po 12 miesiącach przechowywania (suszenie metodą fluidyzacji 4,5% do 1,1%).

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 2

Summary

Storage experience lasted 12 months. After twelve months of the experiment there were significant differences in the course of the survival curves of bacteria. This applies to both strains tested and methods for their preservation and storage conditions. Preparations made using the fluidized drying had worse survival of the cells compared to the formulations obtained by freeze-drying, regardless of the strain and the storage conditions. Survival of freeze-dried bacteria was between 17.9% and 92.0% after 12 months of storage (fluidized bed drying method 1.1 to 4.5%).

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

WPROWADZENIE

W pierwszej części artykułu opisano doświadczenia obejmujące hodowle bakterii w skali półtechnicznej, prowadzone w celu uzyskania odpowiedniej ilości biomasy bakterii do doświadczeń, z której następnie uzyskano materiał badawczy w postaci liofilizatów oraz preparatów wykonanych techniką suszenia fluidyzacyjnego (stanowiących materiał porównawczy). Określono również przeżywalność bakterii w preparatach wykonanych obiema technikami dehydratacji.

Treść drugiej części tego artykułu zawiera opis dalszych doświadczeń, polegających na przechowywaniu preparatów w różnych warunkach, oraz wynikające z nich wnioski.

Badania zmian aktywności biologicznej preparatów w czasie przechowywania w różnych warunkach

Doświadczenia trwały 12 miesięcy. Schemat doświadczeń przedstawiono w tabeli 1. w pierwszej części artykułu; próbki z każdego wariantu eksperymentu pobierano w odstępach miesięcznych (w okresie od 8. do 12. miesiąca co 2 miesiące). Początkowa liczba bakterii w preparatach suszonych fluidyzacyjnie wynosiła od $1,23 \cdot 10^{10}$ do $6,0 \cdot 10^{10}$ jtk/g, zaś w preparatach poddanych suszeniu sublimacyjnemu od $1,79 \cdot 10^{11}$ do $3,1 \cdot 10^{11}$ jtk/g. Ze względu na różne wartości początkowe bezpośrednie porównanie wyników posiewów uzyskiwanych systematycznie w czasie trwania doświadczeń przechowalniczych byłoby więc niecelowe. Dlatego dla scharakteryzowania postępujących zmian posłużono się przeżywalnością. Wyniki każdego wariantu doświadczenia przedstawiono na oddzielnych wykresach oznaczonych numerami od 2 do 13. Wyniki dotyczące konkretnej metody dehydratacji oraz sposobu przechowywania pogrupowano po trzy, z których każdy dotyczył innego badanego szczepu bakterii, w celu umożliwienia łatwiejszej oceny różnic w przebiegu krzywych utraty aktywności biologicznej w czasie przechowywania. Wartości liczbowe przedstawione na wykresach to przeżywalność bakterii w danym momencie doświadczenia, liczona jako stosunek aktualnej liczby bakterii do ich liczby początkowej (bezpośrednio po suszeniu), wyrażony w procentach. Krzywe oznaczone na wykresach symbolem „▲” dotyczą przechowywania w temperaturze pokojowej, zaś oznaczone symbolem „●” odnoszą się do chłodniczej temperatury przechowywania.

Po 12 miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych liczba bakterii w preparatach suszonych fluidyzacyjnie wahała się od $4,6 \cdot 10^6$ do $1,1 \cdot 10^8$ jtk/g, natomiast przechowywanych w temperaturze pokojowej – od $2,2 \cdot 10^5$ do $9,0 \cdot 10^7$ jtk/g. W preparatach liofilizowanych i przechowywanych w warunkach chłodniczych liczba bakterii

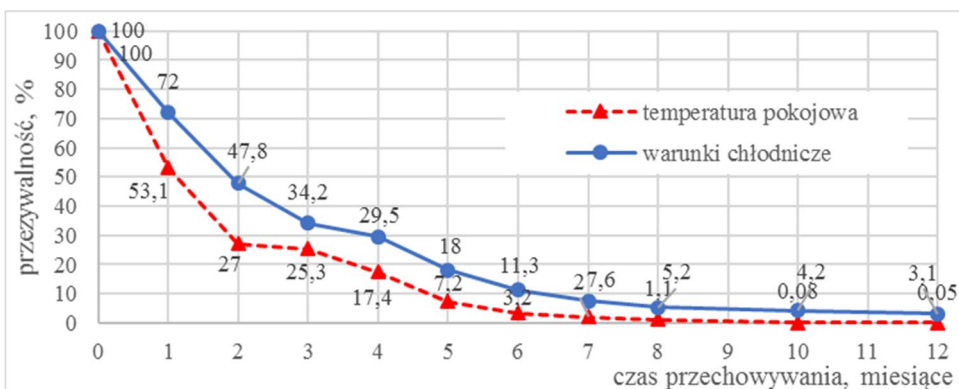
wynosiła od $6,0 \cdot 10^{10}$ do $2,9 \cdot 10^{11}$ jtk/g, a przechowywanych w temperaturze pokojowej od $2,0 \cdot 10^6$ do $3,9 \cdot 10^{10}$ jtk/g.

Pierwsza grupa wykresów (rysunki 2–4) dotyczy suszenia fluidyzacyjnego oraz przechowywania preparatów w powietrzu w polietylenowych pojemniczkach. Wyniki te stanowią materiał porównawczy, ponieważ tą metodą i w takich warunkach otrzymywano, a następnie przechowywano, preparaty przed rozpoczęciem niniejszych badań. Metoda ta nie dawała zadowalających wyników w trakcie dłuższego przechowywania preparatów.

W przypadku wszystkich badanych szczepów następowała dość szybka utrata aktywności zawierających je preparatów w czasie pierwszych sześciu miesięcy przechowywania do poziomu $28,5 \div 10,1\%$, czyli o rząd wielkości, w przypadku przechowywania w warunkach chłodniczych oraz do poziomu $5,9 \div 3,2\%$ początkowej liczby bakterii w przypadku przechowywania w temperaturze pokojowej, czyli o dwa rzędy wielkości mniej. Odpowiednio po 12 miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych przeżywalność wynosiła $4,5$ do $1,1\%$, czyli obniżała się o 2 rzędy wielkości, a w przypadku przechowywania w temperaturze pokojowej spadała do $0,8 \div 0,009\%$, czyli obniżała się o od 3 do 5 rzędów wielkości, w zależności od badanego szczepu.

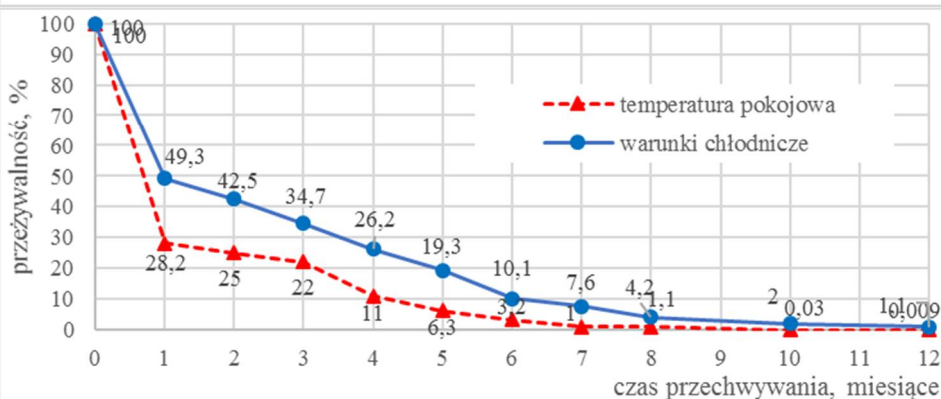
Stosunkowo najlepsze wyniki uzyskano dla szczepu *Lactobacillus buchneri* KKP 2047, szczególnie w przypadku przechowywania w temperaturze pokojowej – obniżenie przeżywalności o 3 rzędy wielkości liczby bakterii, podczas gdy w przypadku szczepu *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 i *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 odpowiednio obniżenie przeżywalności wynosiło 4 i 5 rzędów wielkości, w stosunku do ich początkowej liczby.

Niewielki wpływ na wyniki miało zastosowanie, do tych samych próbek co poprzednio, opakowań próżniowych – woreczków polietylenowych barierowych, powlekanych folią aluminiową (rysunki 5–7). Krzywe na wykresach miały przebieg zbliżony do przedstawionych na rysunkach 2–4, szczególnie do 6 miesiąca przechowywania. Po tym okresie zaczęły występować wyraźniejsze różnice, na niekorzyść tej metody. W przypadku przechowywania preparatów w temperaturze chłodniczej przez 12 miesięcy przeżywalność wynosiła od $3,1\%$ do $0,07\%$, czyli następował spadek mierzonego parametru o 2 do 4 rzędów wielkości, a w przypadku przechowywania w temperaturze pokojowej przeżywalność wynosiła od $0,02\%$ do $0,002\%$, czyli spadek liczby bakterii wynosił od 4 do 5 rzędów wielkości. Podobnie jak poprzednio stosunkowo najlepsze wyniki uzyskano w przypadku szczepu *Lactobacillus buchneri* KKP 2047, a najgorsze w przypadku szczepu *Lactobacillus plantarum* K KKP 593.



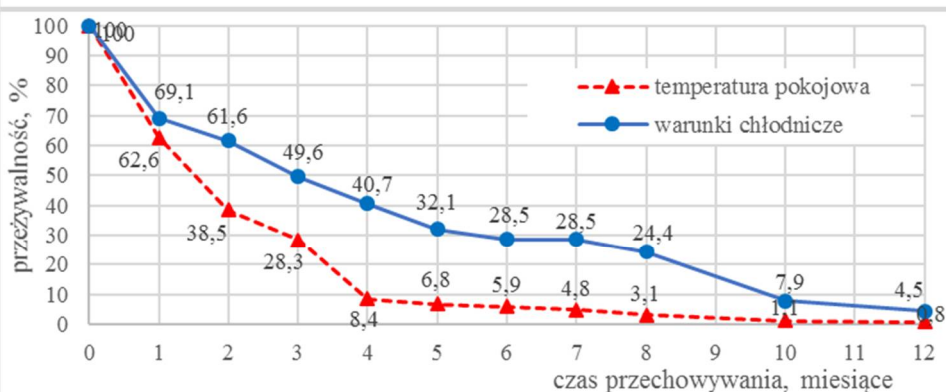
Rys. 2. Przeżywalność suszonych fluidyzacyjnie bakterii *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 w czasie przechowywania w buteleczkach, w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych

Fig. 2. Survivability of *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 bacteria, dried



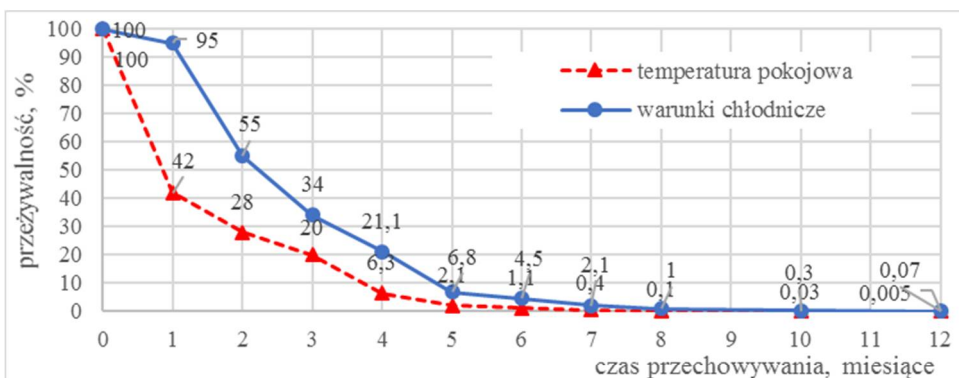
Rys. 3. Przeżywalność suszonych fluidyzacyjnie bakterii *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 w czasie przechowywania w buteleczkach, w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych

Fig. 3. Survivability of *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 bacteria, dried



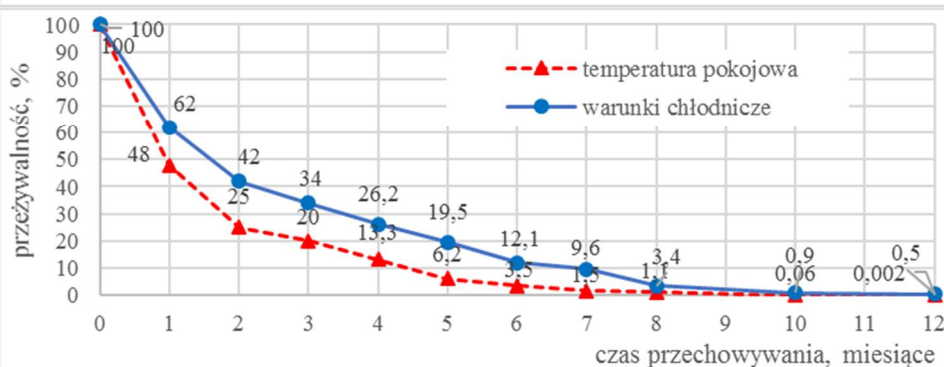
Rys. 4. Przeżywalność suszonych fluidyzacyjnie bakterii *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 w czasie przechowywania w buteleczkach, w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych

Fig. 4. Survivability of *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 bacteria, dried by



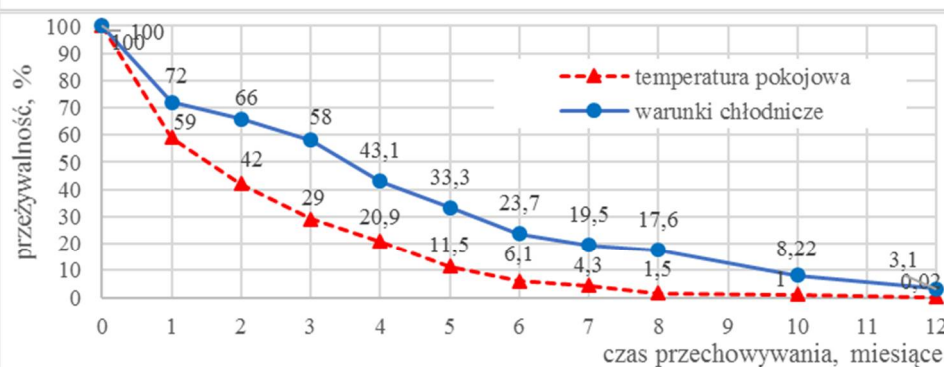
Rys. 5. Przeżywalność suszonych fluidyzacyjnie bakterii *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 w czasie przechowywania w saszetkach (próżnia), w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych

Fig. 5. Survivability of *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 bacteria



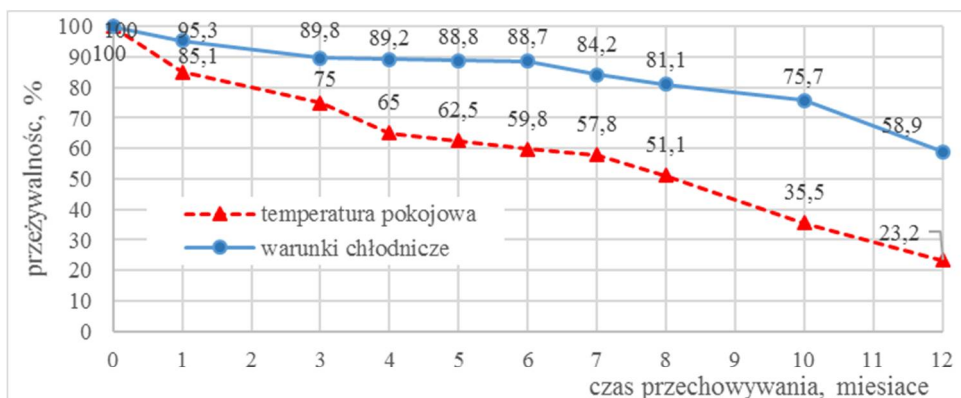
Rys. 6. Przeżywalność suszonych fluidyzacyjnie bakterii *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 w czasie przechowywania w saszetkach (próżnia), w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych

Fig. 6. Survivability of *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 bacteria



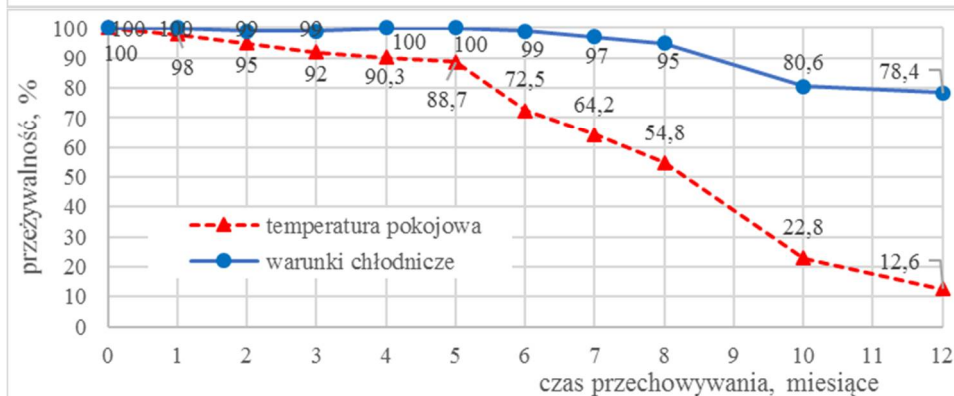
Rys. 7. Przeżywalność suszonych fluidyzacyjnie bakterii *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 w czasie przechowywania w saszetkach (próżnia), w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych

Fig. 7. Survivability of *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 bacteria, d



Rys. 8. Przeżywalność liofilizowanych bakterii *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 w czasie przechowywania w buteleczkach, w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych

Fig. 8. Survivability of lyophilized *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 bacteria duri



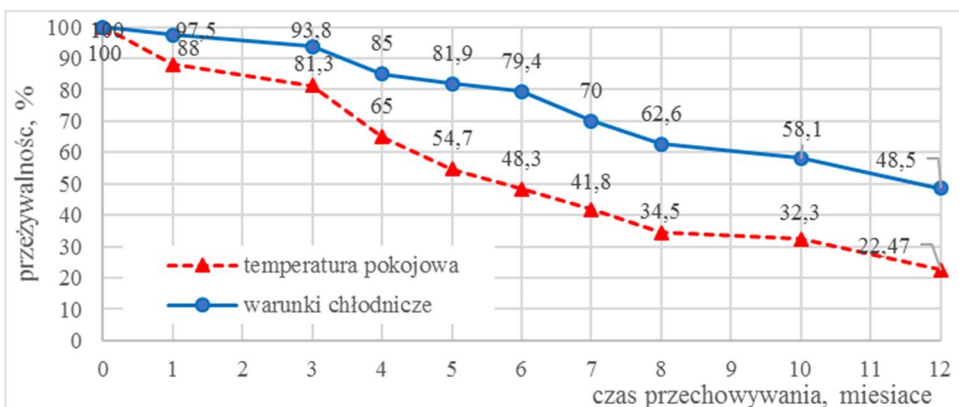
Rys. 9. Przeżywalność liofilizowanych bakterii *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 w czasie przechowywania w buteleczkach, w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych

Fig. 9. Survivability of lyophilized *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 bacteria duri

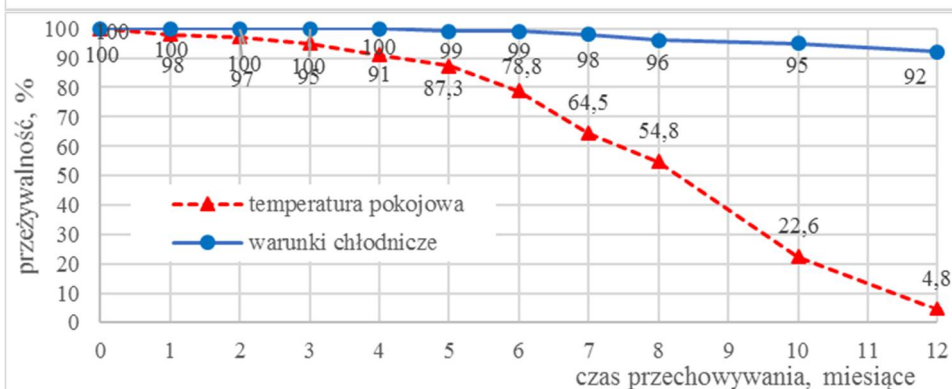


Rys. 10. Przeżywalność liofilizowanych bakterii *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 w czasie przechowywania w buteleczkach, w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych

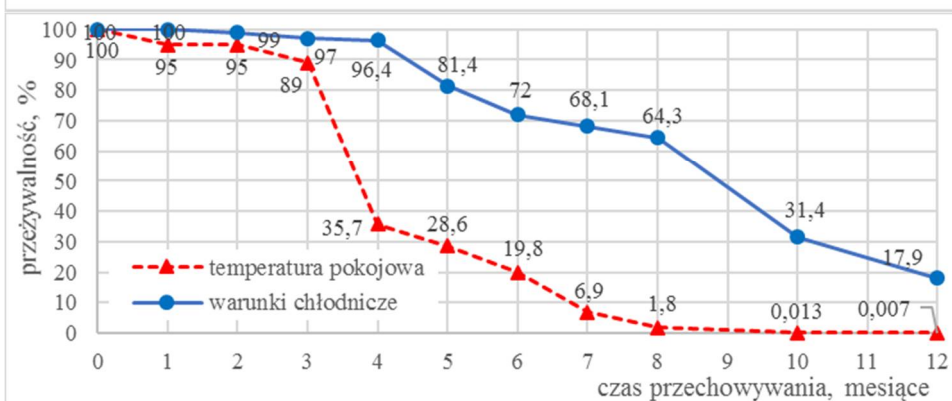
Fig. 10. Survivability of lyophilized *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 bacteria durin



Rys. 11. Przeżywalność liofilizowanych bakterii *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 w czasie przechowywania w saszetkach (próżnia), w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych
Fig. 11. Survivability of lyophilized *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 bac



Rys. 12. Przeżywalność liofilizowanych bakterii *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 w czasie przechowywania w saszetkach (próżnia), w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych
Fig. 12. Survivability of lyophilized *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 bac



Rys. 13. Przeżywalność liofilizowanych bakterii *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 w czasie przechowywania w saszetkach (próżnia), w temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych
Fig. 13. Survivability of lyophilized *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 bacteri

Zastosowanie metody suszenia sublimacyjnego pozwoliło uzyskać znacznie lepsze wyniki. Przeżywalność bakterii liofilizowanych, a następnie przechowywanych w polietylenowych pojemniczkach (rysunki 8–10) obniżała się znacznie wolniej niż w czasie wcześniej opisanych eksperymentów dotyczących suszenia fluidyzacyjnego. W przypadku szczepu bakterii *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 po 12 miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych wynosiła ona 58,9%, dla szczepu *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 wynosiła 78,4%, a dla szczepu *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 – 21,8%, czyli nastąpił spadek aktywności, wyrażonej jako przeżywalność, jedynie o 1 rząd wielkości. Również w przypadku przechowywania liofilizatów w temperaturze pokojowej uzyskano znacznie lepsze wyniki od danych doświadczalnych dotyczących preparatów suszonych fluidyzacyjnie. Podwyższenie przeżywalności bakterii w preparatach dotyczy przede wszystkim pierwszych 6 miesięcy przechowywania, które to wyniki można uznać za bardzo dobre. Uzyskana przeżywalność to 59,8% w przypadku szczepu *Lactobacillus plantarum* K KKP 593, 72,5% – dla szczepu *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 oraz 25% – dla szczepu *Lactobacillus buchneri* KKP 2047. Kolejne 6 miesięcy przechowywania spowodowało dalszy spadek przeżywalności bakterii, która obniżyła się do 23,2% w przypadku szczepu *Lactobacillus plantarum* K KKP 593, 12,6% – dla szczepu *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 (w sumie spadek przeżywalności o 1 rząd wielkości) oraz 0,03% – dla szczepu *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 (spadek przeżywalności o 4 rzędy wielkości). Przedstawione wyniki wskazują, że suszony sublimacyjnie szczep *Lactobacillus buchneri* KKP 2047 gorzej znosi przechowywanie w temperaturze pokojowej w porównaniu ze szczepami *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 oraz *Lactobacillus plantarum* C KKP 788, szczególnie w okresie od 6. do 12. miesiąca przechowywania w temperaturze pokojowej (spadek o trzy rzędy wielkości). W tym okresie podczas przechowywania w temperaturze pokojowej uzyskano nawet gorszy wynik niż w przypadku suszenia fluidyzacyjnego.

Kolejna grupa wykresów (rysunki 11–13) ilustruje wyniki dotyczące preparatów liofilizowanych i ich przechowywania w opakowaniach próżniowych – barierowych woreczkach polietylenowych. Wykreślone krzywe zmian przeżywalności bakterii w czasie przechowywania, zarówno w warunkach chłodniczych, jak i w temperaturze pokojowej, miały zbliżony przebieg do otrzymanych w przypadku przechowywania preparatów w powietrzu w polietylenowych pojemniczkach, a końcowe wyniki, tzn. po 12 miesiącach przechowywania, nieznacznie różniły się od siebie, w większości na niekorzyść przechowywania preparatów w próżni w woreczkach barierowych. Po 12 miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych przeżywalność bakterii wahała się w granicach

od 17,9% do 92,0% ich liczby początkowej, czyli następował spadek o 1 rząd wielkości, a w temperaturze pokojowej w granicach od 0,007% do 22,47%, czyli spadek przeżywalności wynosił od 1 do 5 rzędów wielkości.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że w przypadku preparatów otrzymywanych metodą suszenia fluidyzacyjnego zmiana warunków przechowywania, tzn. przechowywanie w powietrzu bądź w atmosferze próżni, nie miała istotnego wpływu na uzyskiwane przeżywalności bakterii w preparatach po 12 miesiącach przechowywania. Można nawet stwierdzić, że preparaty przechowywane w próżni przechowywały się nieznacznie gorzej w porównaniu z przechowywanymi w powietrzu.

Zastosowanie suszenia sublimacyjnego, prowadzonego z wykorzystaniem parametrów opracowanych we wcześniejszych pracach badawczych, znacznie poprawiło przeżywalność bakterii w czasie przechowywania przez 12 miesięcy. W przypadku przechowywania w warunkach chłodniczych uzyskano znaczącą poprawę przeżywalności wszystkich trzech badanych szczepów bakterii, niezależnie od zastosowanych opakowań, czyli atmosfery, w jakiej przechowywano preparaty. W przypadku temperatury pokojowej istotną poprawę przeżywalności po 6 miesiącach przechowywania uzyskano w przypadku wszystkich badanych szczepów bakterii, niezależnie od zastosowanych opakowań. Po 12 miesiącach przechowywania poprawa nastąpiła natomiast w przypadku dwóch szczepów – *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 i *Lactobacillus plantarum* C KKP 788, w stosunku do preparatów otrzymanych drogą suszenia fluidyzacyjnego. W przypadku szczepu *Lactobacillus buchneri* KKP 2047, w okresie od 6. do 12. miesiąca przechowywania, następował istotny spadek przeżywalności – o jeden rząd wielkości większy niż w przypadku preparatów suszonych metodą fluidyzacji, a przechowywanych w analogicznych warunkach.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy nie są zgodne z danymi literaturowymi. Dane zawarte w dostępnej literaturze wskazują, że przechowywanie mikroorganizmów w warunkach próżni poprawia przeżywalność w czasie przechowywania w porównaniu z przechowywaniem w powietrzu, co przypisywane jest np. procesom dyfuzji tlenu do komórek poprzez wysuszoną powierzchnię międzyfazową [Bozoğlu i in. 1987]. Porter i wsp. również stwierdzili podobną zależność – zarówno w temperaturze chłodniczej (4°C), jak i pokojowej (25°C) badane przez nich bakterie przeżywały lepiej w przypadku przechowywania w próżni niż w atmosferze azotu, który z kolei dawał lepsze efekty niż

przechowywanie w powietrzu. Po przechowywaniu przez 1 miesiąc w temperaturze 4°C i 25°C zaobserwowano w tych badaniach niewielkie różnice pomiędzy przechowywaniem w różnych atmosferach, jednak po 2 i 3 miesiącach przechowywania różnice stawały się większe. Na przykład różnica pomiędzy przechowywaniem w powietrzu 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]. Podobne wyniki uzyskali Yi-Chieh Wang i wsp. w badaniach nad przeżywalnością bakterii z rodzajów *Streptococcus*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Stwierdzono, że przechowywanie w warunkach próżni daje lepsze wyniki niż przechowywanie w polietylenowych opakowaniach zaopatrzonych w osuszacze. Stwierdzono też, że istotny wpływ na przeżywalność bakterii miała temperatura przechowywania – uzyskano lepsze rezultaty w temperaturze 4°C niż w trakcie przechowywania preparatów bakteryjnych w temperaturach przekraczających 25°C [Yi-Cheh Wang i in. 2004].

Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że metoda dehydracji opracowana w wyniku realizacji cyklu prac daje równie dobre wyniki zarówno w przypadku przechowywania w próżni, jak i w atmosferze powietrza. Można to uznać za atut tej metody, ponieważ daje to większe możliwości konfekcjonowania preparatów otrzymywanych tą metodą, a zatem podnosi również ich atrakcyjność handlową. Potwierdził się natomiast związek przeżywalności z temperaturą przechowywania – w niniejszej pracy również uzyskiwano lepsze wyniki przeżywalności bakterii w preparatach przechowywanych w temperaturze chłodniczej niż w temperaturze pokojowej.

WNIOSKI

1. Opracowana metoda dehydracji przebadanych szczepów, stosowanych w biopreparatach do kiszenia pasz, umożliwia otrzymywanie produktów o trwałości na takim samym poziomie, jak trwałość podobnych produktów firm zachodnich obecnych na krajowym na rynku; po 12 miesiącach przechowywania w warunkach chłodniczych przeżywalność bakterii wahała się w granicach od 17,9% do 92,0%.
2. Niezależnie od szczepu bakterii i zastosowanej metody przechowywania preparaty wykonane z zastosowaniem suszenia fluidyzacyjnego charakteryzują się znacznie gorszą przeżywalnością w porównaniu z preparatami uzyskanymi poprzez liofilizację.
3. Opracowana metoda dehydracji została wdrożona w półtechnicznej linii produkcyjnej biopreparatów ZF IBPRS, co zmniejsza znacznie pracochłonność produkcji,

umożliwiając obniżenie ceny sprzedawanych produktów, oraz podnosi ich atrakcyjność rynkową ze względu na poprawę trwałości w czasie przechowywania przez 12 miesięcy.

PIŚMIENNICTWO

1. Abadias M., Benabarre A., Teixidó N., Usall J., Viñas I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.*, 65, 173-182
2. Bâati L., Fabre-Gea C., Auriol D., Blanc P. J. (2000). Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *Int. J. Food Microbiol.*, 59, 241-247
3. Bednarski W. (2003). *Biotechnologia żywności*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne
4. Bednarski W. (2007). *Podstawy biotechnologii przemysłowej*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne
5. Bednarski W. (1990). Wybrane aspekty utrwalania oraz przechowywania szczepów drobnoustrojów przemysłowych. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 3, 13-15
6. Bergenholtz Å. S., Wessman P., Wuttke A., Håkensson S. (2012). A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. *Cryobiology*, 64, 152-159
7. Bozoğlu T. F., Öziglen M., Bakir U. (1987). Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme Microbiobial Technol.*, 9, 531-537
8. Carvalho S. A., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata X. F., Gibbs P. (2004). Relevant factors for preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 14, 835-847
9. Champagne C. P., Mondou F., Raymond Y., Roy D. (1996). Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Res. Int.*, 29, 555-562
10. Chmiel A. (1998). *Biotechnologia – podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*. Warszawa: Wydawnictwo PWN
11. Ciurzyńska A., Lenart A. (2011). Freeze-drying – application in food processing and biotechnology – A review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 61, 165-171
12. De Giulio B., Orlando P., Barba G., Coppola R., De Rosa M., Sada A., De Prisco P. P., Nazzaro F. (2005). Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 739-746

13. Dziugan P. (2009). Kinetyka suszenia sublimacyjnego piekarskiej kultury starterowej. *Chłodnictwo*, 4, 46-48
14. Hubálek Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, 205-229
15. Kanmani P., Kumar R. S., Yuvaraj N., Paari K. A., Pattukumar V., Arul V. (2011). Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochem. Eng. J.*, 58-59, 140-147
16. Kawała Z., Kapłon J., Kramkowski R. (1993). Ważniejsze aspekty suszenia sublimacyjnego. *Przem. Spoż.*, 3, 64-67
17. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (2009). *Mikrobiologia techniczna. Tom 1. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN
18. Liu Y., Zhao Y., Feng X. (2007). Exergy analysis for a freeze-drying process. *Appl. Thermal Eng.*, 28, 675-690
19. Meng X. C., Stanton C., Fitzgerald G. F., Daly C., Ross R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.*, 106, 1406-1416
20. Miyamoto-Schinohara Y., Imaizumi T., Sukenobe J., Murakami Y., Kawamura S., Komatsu Y. (2000). Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*, 41, 251-255
21. Morgan C. A., Herman N., White P. A., Vesey G. (2006). Preservation of microorganisms by drying – A review. *J. Microbiol. Meth.*, 66, 183-193
22. Passot S., Cenard S., Douania I., Tréléa I. C., Fonseca F. (2012). Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilized lactic acid bacteria. *Food Chem.*, 132, 1699-1705
23. PN-EN 15787:2009, Pasze. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Lactobacillus spp*
24. Połomska X., Wojtatowicz M., Żarowska B., Szołtysik M., Chrzanowska J. (2007). Skryning podłoży do produkcji liofilizowanych szczepionek drożdżowych dla serowarstwa. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 6, 3-14
25. Porter D. C., Leuschner R. G. K., Murray B. S. (2007). Optimizing the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*, 54, 265-270
26. Ratti C. (2001). Hot air and freeze-drying of high value foods: a review. *J. Food Eng.*, 49, 311-319

27. Saarela M., Virkajärvi I., Alakomi H.-L., Mattila-Sandholm T., Vaari A., Suomalainen T., Mättö J. (2005). Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* cells produced without milk-based ingredients. J. Appl. Microbiol., 99, 1330-1339
28. Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. (2008). Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. Food Microbiol., 25, 429-441
29. Schoug Å., Olsson J., Carlfors J., Schnürer J., Håkansson S. (2006). Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3-effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. Cryobiology, 53, 119-127
30. Skoneczna J., Ciesielczyk W. (2010). Możliwości suszenia fluidyzacyjnego wybranych rodzajów biomasy. Chemia. Czasopismo Techniczne. Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej, 10, 299-308
31. Yi-Chieh Wang, Roch-Chui Yu, Cheng-Chun Chuo (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. Int. J. Food Microbiol., 93, 209-217
32. Zayed G., Roos Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. Process Biochem., 39, 1081-1086
33. Zhao G., Zhang G. (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. J. Appl. Microbiol., 99, 333-338