



Metody zwiększania przeżywalności bakterii mlekowych poddawanych suszeniu rozpyłowemu

Szymon Powalowski, Paweł Cyplik

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Methods for improving of lactic acid bacteria survival during spray drying

Summary

Lactic acid bacteria are a group of microorganisms which have been used by people for centuries. Ever since, attention was drawn to their probiotic properties, interest in different applications of lactic acid bacteria has been growing steadily. The need to ensure both high quality and repeatability of production stimulates the demand for bacterial cultures which are ready to use and which are characterized by high viability and cell activity. At present, in order to produce such ready-to-use lactic bacteria cultures, the processes of freezing and freeze drying are usually employed. However, in their search for possibilities to reduce the production costs, the researchers have turned their attention to the process of spray drying. The conditions typical of the process of drying and re-sulting from the effect of high temperature and rapid dehydration of bacterial cells are not conducive to viability. However, the use of results of tests explaining mechanisms responsible for the survival of bacterial cells under stress conditions, combined with the application of carriers and auxiliary substances, increases the possibility of applying spray drying effectively in the production of fixed lactic acid bacteria cultures.

Key words:

spray drying, lactic acid bacteria, starter cultures, probiotics.

Adres do korespondencji

Szymon Powalowski,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza,
ul. Wojska Polskiego 48,
61-627 Poznań.

1. Wprowadzenie

Bakterie fermentacji mlekowej odgrywają bardzo ważną rolę w przemyśle spożywczym oraz w żywieniu człowieka. Są one zaliczane do grupy organizmów bezpiecznych (GRAS – *generally*

recognized as safe) i od wieków są wykorzystywane do produkcji fermentowanych napojów mlecznych oraz produktów poddawanych kiszeniu. W ostatnich latach dodatkowo wzrasta zainteresowanie ich właściwościami probiotycznymi oraz zdolnością do produkcji bakteriocyn. Substancje te, mające zazwyczaj charakter białkowy, mogą wykazywać antagonistyczne działanie przeciwko bakteriom chorobotwórczym (1). Cechy te sprawiają, że gwałtownie wzrosło wykorzystanie bakterii mlekowych w przemyśle spożywczym. Konieczność produkcji preparatów bakteryjnych o stałej, wysokiej i gwarantowanej jakości wymaga doskonalenia metod utrwalania biomas bakteryjnych gwarantujących dużą żywotność i aktywność fermentacyjną komórek (2,3). Za stosowaniem gotowych, utrwalonych preparatów przemawiają również wymogi związane z automatyzacją procesów technologicznych oraz utrzymaniem higieny produkcji (4).

2. Suszenie rozpyłowe preparatów bakterii mlekowych

Najprostszą formą przechowywania kultur bakteryjnych jest ich mrożenie. Pozwala ono na zachowanie wysokiej przeżywalności komórek. Preparaty mrożone muszą jednak być przez cały czas utrzymywane w niskiej temperaturze i odznaczają się znaczną masą objętościową, co wpływa na wzrost kosztów ich przechowywania i transportu. Fakt ten jest jedną z przyczyn zainteresowania preparatami suszonymi. Obok liofilizacji suszenie rozpyłowe jest metodą, która może być wykorzystywana do przemysłowej koncentracji biomasy. Za zastosowaniem suszenia rozpyłowego do utrwalania biomasy przemawiają przede wszystkim znacznie niższe koszty, które są sześć razy niższe niż koszty liofilizacji (5). Dodatkowym atutem suszenia rozpyłowego jest możliwość stosowania procesu na dużą skalę oraz niska waga uzyskiwanego produktu, pozwalająca na obniżenie kosztów transportu (2,6).

Pomysł zastosowania tej metody do utrwalania biomasy należy datować na początki dwudziestego wieku. Już pierwsze prowadzone badania dotyczyły stosowania uzyskanych preparatów jako starterów w przemyśle mleczarskim (wg 7). Uzyskane wówczas wyniki były obiecujące, a od czasu tamtych prób, w rezultacie optymalizacji procesu, znacznie poprawiono jakość uzyskiwanych preparatów. Do dziś jednak metoda ta nie doczekała się pełnego wdrożenia. Przyczynami tego są głównie mała przeżywalność kultur bakteryjnych, ich niska stabilność podczas przechowywania oraz zła zwilżalność produktu, utrudniająca rehydrację (8,9).

Trudności związane ze zwilżalnością dotyczą wszystkich produktów suszonych rozpyłowo. Jest to w dużej mierze związane z bardzo małymi rozmiarami cząstek, wahającymi się zazwyczaj w zakresie 10-100 μm . Problem ten może być eliminowany lub ograniczany dzięki zastosowaniu aglomeracji, np. przez granulację w złożu fluidalnym, czyli zwilżanie unoszonego nadmuchem powietrza materiału. Produkty poddane aglomeracji, w porównaniu do wyjściowego produktu suszonego rozpyłowo, odznaczają się znacznie lepszą rozpuszczalnością i dyspersyjnością w roztwo-

rach wodnych. Ponadto są mniej podatne na zbrylanie podczas przechowywania (10,11).

Problemy niedostatecznej przeżywalności i stabilności podczas przechowywania preparatów suszonych rozpyłowo związane są z licznymi czynnikami i stanowią źródło zainteresowania wielu badaczy. Głównymi aspektami, które należy rozpatrywać w tym przypadku, są faza wzrostu drobnoustrojów, zagęszczenie składników cytoplazmy spowodowane odparowaniem wody, działanie temperatury i ciśnienia osmotycznego podczas procesu oraz warunki rehydratacji. Czynniki te mogą powodować uszkodzenia struktur komórkowych, a zwłaszcza błony cytoplazmatycznej (6).

Analizując uszkodzenia komórek powstające w procesie suszenia rozpyłowego, należy wyodrębnić dwie podstawowe ich grupy: uszkodzenia związane z działaniem temperatury i z odwodnieniem. Związana z oddziaływaniem temperatury **inaktywacja termiczna** powodowana jest głównie przez denaturację DNA, RNA oraz białek. Uszkodzenia błony cytoplazmatycznej, prowadzące do utraty przez komórkę turgoru, uważane są za jedną z podstawowych przyczyn **inaktywacji dehydratacyjnej** (12). Podczas suszenia biomasy, wraz ze zmniejszaniem się ilości wody zawartej w komórkach, wzrasta stężenie rozpuszczonych substancji (13). Oznacza to wzrost ciśnienia osmotycznego wewnątrz komórki i może prowadzić do plazmolizy oraz wysalania białek. Zmiany te często są nieodwracalne i powodują śmierć komórki. Mimo że inaktywacja termiczna może być znacznie zredukowana przez optymalizację procesu, to inaktywacja dehydratacyjna stanowi główny problem przy stosowaniu konwekcyjnych metod suszenia (12). W przypadku suszenia rozpyłowego występują oba typy inaktywacji. Część zmian zachodzących w komórkach i mechanizmów za nie odpowiedzialnych jest podobna. Dowiedziono jednak, że procesy te różnią się zasadniczo (14). Wynikiem tego są odrębne uszkodzenia wywołane działaniem temperatury i odwadnianiem komórki. Powoduje to, że badania nad przeżywalnością komórek w procesie suszenia rozpyłowego mają charakter złożony, a uzyskiwane wyniki mogą być trudne do interpretacji. Postęp w badaniach dokonany w ostatnich latach oraz wzrost wiedzy z zakresu osmoregulacji pozwalają coraz skuteczniej zapobiegać obumieraniu komórek podczas suszenia i przechowywania.

3. Metody oceny jakości preparatów suszonych rozpyłowo

Ze względów technologicznych preparaty kultur starterowych powinny wykazywać dużą zdolność do szybkiego inicjowania fermentacji oraz odznaczać się odpowiednią produktywnością pożądaných metabolitów (3,6,9).

W procesach koncentracji biomasy (suszenie rozpyłowe, liofilizacja czy zamrażanie) komórki narażone są, o czym była już mowa, na szereg czynników stresowych, mogących uszkadzać ich strukturę. Niezbędne zatem są metody weryfikacji jakości otrzymywanych preparatów, pozwalające na określenie stopnia uszkodzenia komórek. W dostępnej literaturze spotkać można próby stosowania wielu technik,

zmierzających głównie do określenia integralności ściany komórkowej i przepuszczalności błony cytoplazmatycznej oraz stopnia uszkodzenia DNA (7,14). Z powodzeniem mogą być stosowane techniki bazujące na biologii molekularnej, mikroskopii, zwłaszcza fluorescencyjnej, ale także proste testy hodowlane.

Jednym z wyznaczników odzwierciedlających stopień uszkodzenia ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej jest wrażliwość komórek na NaCl. Oznaczenie tego parametru jest przykładem zastosowania metod hodowlanych (6,9). Wraz ze wzrostem stopnia uszkodzenia, ściana komórkowa z błoną cytoplazmatyczną przestają stanowić efektywną barierę dla soli, która, wnikając do wnętrza, inaktywuje komórkę (2). Poza tym zdolność do wzrostu w środowisku o podwyższonym stężeniu NaCl jest, w przypadku szczepów fermentacji mlekowej często cechą pożądaną ze względów technologicznych. W badaniach prowadzonych z wykorzystaniem *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, po procesie suszenia rozpyłowego stwierdzono wzrost wrażliwości komórek na NaCl. Świadczy to o uszkodzeniu błony cytoplazmatycznej w trakcie suszenia (6). Również w preparatach suszonych komórek *Lactococcus lactis* i *Lactobacillus curvatus* obserwowano wzrost wrażliwości na NaCl. Zjawisko to miało jednak charakter przejściowy i po 72 h hodowli komórki przestawały wykazywać wrażliwość, co autorzy tłumaczą regeneracją uszkodzeń powstałych w procesie suszenia (9). Do oceny stopnia uszkodzenia ściany komórkowej oraz błony cytoplazmatycznej stosowano również DNazy. Metoda ta polega na inkubacji komórek w roztworze aktywnej DNazy i późniejszym pomiarze ilości produktów rozkładu DNA, przy założeniu, że enzym może wnikać i hydrolizować DNA jedynie w komórkach uszkodzonych (14). Na podobnej zasadzie opiera się testowanie wrażliwości komórek na lizozym oraz niektóre antybiotyki, np. penicylinę. Wzrost wrażliwości interpretowany jest tu jako pojawienie się uszkodzeń ściany komórkowej (7).

Wśród metod oceny jakości otrzymywanych preparatów spotkać można również oznaczanie aktywności β -galaktozydazy, zwykle metodą opartą na rozkładzie ONPG (*o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu). Również pomiar ilości jonów potasu oraz białek przedostających się do supernatantu może dostarczać informacji o stopniu uszkodzenia błony cytoplazmatycznej (6,14).

Gardiner i in. (2) z powodzeniem zastosowali do oceny przeżywalności suszonych rozpyłowo komórek bakterii z rodzaju *Lactobacillus* konfokalną mikroskopię fluorescencyjną. Metoda ta jest szybka i skuteczna, a zastosowanie selektywnych barwników fluorescencyjnych pozwala na uzyskanie dodatkowych informacji o stanie fizjologicznym komórki.

4. Możliwości poprawy przeżywalności bakterii w preparatach suszonych rozpyłowo

Niezbędnym warunkiem otrzymania preparatu suszonych komórek bakteryjnych o wysokiej przeżywalności i aktywności jest właściwy dobór parametrów procesu.

Mimo że temperatura wlotowa suszącego powietrza może przekraczać nawet 200°C, komórki przeżywają. Intensywnie parująca woda, pobierając z otoczenia energię niezbędną na pokrycie ciepła parowania, schładza powierzchnię produktu. Suszony produkt ogrzewa się dopiero, wtedy gdy jako proszek opuszcza komorę suszarni, a jego temperatura jest wówczas równa temperaturze powietrza wylotowego (8,11,15). Dlatego, najważniejszym z parametrów decydujących o przeżywalności jest temperatura powietrza wylotowego (16,17). Na podstawie dostępnej literatury można określić, że dla większości szczepów bakterii fermentacji mlekowej wartość tej temperatury mieści się w zakresie od 60 do 85°C (2,6,18). Istnieją jednak doniesienia, że także wzrost temperatury wlotowej wpływa na spadek przeżywalności komórek (9). Cennych informacji ułatwiających dobór temperatur suszenia może dostarczyć określenie termotolerancji szczepu (2). Parametr ten należy wszakże traktować jedynie pomocniczo, gdyż na inaktywację komórek podczas suszenia rozpyłowego, oprócz temperatury, wpływa również odwodnienie, związane ze wspomnianą wcześniej inaktywacją dehydratacyjną. Trzeba jednak pamiętać, że inaktywacja termiczna ma znaczny udział w grupie czynników letalnych działających na komórki podczas suszenia. Wrażliwość termiczna jest cechą indywidualną każdego szczepu bakterii i często kilka szczepów nawet bardzo blisko spokrewnionych ze sobą może odznaczać się zróżnicowaną wrażliwością (19).

Przeżywalność podczas suszenia oraz stabilność szczepionek podczas przechowywania udaje się poprawić stosując dodatki substancji o charakterze ochronnym. Należą do nich m.in. kwas askorbinowy, glutaminian sodu, ekstrakt drożdżowy, odtłuszczone mleko, maltodekstryny i skrobia. Istnieją również doniesienia, że bakterie mlekowe z powodzeniem suszono w jogurcie (17,20).

Substancje pomocnicze, ze względu na mechanizm ich ochronnego działania, można podzielić na kilka grup. Wśród nich wyróżnić można takie polimery organiczne jak: maltodekstryny o niskim równoważniku glukozowym ($DE \sim 5-10$), skrobia rozpuszczalna, guma arabska, żelatyna i białka mleka. Substancje te, pełniąc rolę nośnika, mogą przez oddziaływania na poziomie molekularnym chronić struktury komórkowe oraz wchodzące w ich skład biopolimery przed denaturacją i uszkodzeniami. Możliwe, że istotny wpływ na stopień uszkodzenia komórek podczas suszenia rozpyłowego mają również właściwości materiału nośnego, decydujące o kształcie, rozmiarze i strukturze cząstek (aglomeratów) powstających podczas suszenia. Parametry te determinują rozkład temperatury oraz dynamikę jej zmian podczas stygnięcia proszku (2,12,18,19).

Kolejną grupę stanowią niskocząsteczkowe substancje organiczne, zaliczane w większości do grona substancji osmoregulacyjnych i osmoochronnych. Niekiedy dodawane są one w postaci naturalnych mieszanin, takich jak ekstrakt drożdżowy bądź mleko, będących bogatymi źródłami betainy (w mleku: 2,3 mg L⁻¹), choliny (w mleku: 79±7 mg L⁻¹), karnityny (w mleku: 10-17 mg L⁻¹) (21). W badaniach prowadzonych nad różnymi gatunkami bakterii, w tym bakteriami fermentacji mlekowej, wykazano, że podwyższone ciśnienie osmotyczne, a w wielu przypadkach również

podwyższona temperatura, powoduje wzrost stężenia tych substancji w cytoplazmie (13,22-24). Stwierdzono, że ich gromadzenie może zachodzić na drodze syntezy wewnątrzkomórkowej lub przez pobranie z otoczenia, do czego komórki wykorzystują specyficzne mechanizmy transportu przez błonę cytoplazmatyczną (25). W wielu badaniach potwierdzono, że substancje te biorą udział w osmoregulacji, pozwalając komórce aktywnie reagować na zmiany ciśnienia osmotycznego w otoczeniu. Sprawne podniesienie stężenia tych substancji wewnątrz komórki umożliwia jej utrzymanie właściwego ciśnienia turgoru, zapobiegając tym samym plazmolizie (26). Poza tym substancje osmoregulacyjne odgrywają istotną rolę w stabilizacji białek oraz w zabezpieczaniu integralności błon komórkowych (27). Wpływają one również ochronnie na zachowanie aktywności enzymów. Jest to możliwe dzięki preferencyjnemu otaczaniu przez substancje osmoregulacyjne cząsteczek makromolekuł takich jak białka, sprzyjające utrzymaniu ich płaszcza hydratacyjnego (28). Dowiedziano też, że mechanizmy i substancje związane z osmoregulacją mogą brać także udział w ochronie komórki przed niekorzystnym oddziaływaniem środowiska, innym niż wzrost lub spadek ciśnienia osmotycznego. W literaturze opisane są przykłady, gdzie komórki bakteryjne poddane działaniu podwyższonego ciśnienia osmotycznego wykazywały wzrost tolerancji na niskie i wysokie temperatury (29,30). Zabieg taki zwiększa również zdolność przetrwania komórek w warunkach dalszego wzrostu ciśnienia osmotycznego (26). Prawdopodobnie proces suszenia rozpyłowego jest zbyt szybki i gwałtowny, aby komórki zdołały uruchomić mechanizmy syntezy bądź pobierania substancji osmoregulacyjnych. Dlatego też korzystne jest ich wcześniejsze przygotowanie, polegające na oddziaływaniu odpowiednimi dawkami czynnika stresowego (13). Dla przykładu, przetrzymanie komórek bakterii *Lactobacillus paracasei* w 0,3 M roztworze NaCl przez 30 minut spowodowało 16-krotny wzrost przeżywalności podczas suszenia w porównaniu z próbą kontrolną. Zabieg ten spowodował jednocześnie ponad 300-krotny wzrost termooporności (18) (patrz: tab.). W przeprowadzonych eksperymentach potwierdzono wzrost przeżywalności podczas suszenia, w wyniku zastosowania zabiegów polegających na oddziaływaniu podwyższonym ciśnieniem osmotycznym. Istnieją dowody, że przeżywalność komórek bakterii poddawanych suszeniu znacząco rośnie, gdy komórki zgromadziły wcześniej w swym wnętrzu substancje osmoregulacyjne, np. betainę. Jest ona najważniejszą substancją osmoregulacyjną znajdowaną u bakterii mlekowych poddanych stresowi osmotycznemu (24). Dla przykładu *Lactobacillus plantarum* hodowane w pożywce z dodatkiem 0,6 M NaCl i w obecności betainy wykazały wzrost przeżywalności podczas suszenia (13). Autorzy dokładnie zbadali wpływ podwyższonego ciśnienia osmotycznego oraz betainy na wzrost i przeżywalność *Lactobacillus plantarum*, opracowując w tym celu specjalne podłoże pozbawione betainy. Poza wzrostem tolerancyjności na czynniki stresowe, w tym związane z suszeniem, u bakterii hodowanych przy podwyższonym ciśnieniu osmotycznym zaobserwowano, że w przypadku zastosowania podłoża z dodatkiem betainy, zwiększa się ich tempo wzrostu i końcowe zagęszczenie komórek, w porównaniu do hodowli na

podłożu bez betainy. Kets i de Bont (13) sugerują również, że szczepy bakterii mlekowych zdolne do wzrostu w warunkach wyższego zasolenia gromadzą wyższe stężenia substancji osmoregulacyjnych i są tym samym lepiej zabezpieczone przed suszeniem. Pozwala to uznać suszenie rozpyłowe za efektywną i bezpieczną metodę ich utrwalania. Przytoczone wyniki badań potwierdzają celowość stosowania podwyższonego ciśnienia osmotycznego w połączeniu z substancjami osmoregulacyjnymi. Autorzy omawianych publikacji podkreślają jednak konieczność doświadczalnego doboru stężenia soli stosowanej do podniesienia ciśnienia osmotycznego. Jest to związane ze zróżnicowaną halotolerancyjnością poszczególnych szczepów bakterii mlekowych.

Tabela

Przykładowe zestawienie wyników przeżywalności uzyskanych podczas suszenia rozpyłowego niektórych gatunków bakterii mlekowych

Bakterie poddane suszeniu	Zastosowane zabiegi mające na celu zwiększenie przeżywalności	Przeżywalność (%)	Literatura
1	2	3	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	suszenie w roztworze odtłuszczonego mleka w proszku	0,3-8	(15)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	suszenie w odtłuszczonej mleku	0,4-18	(15)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	(brak danych)	19,5	(15)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	suszenie w jogurcie; temperatura wylotowa 60°C	22,1	(17)
	suszenie w jogurcie; temperatura wylotowa 75°C	13,7	
<i>Lactobacillus halotolerans</i>	1M NaCl w pożywce podczas hodowli	37	(24)
	1M NaCl i 2 mM betainy w pożywce podczas hodowli	55	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	przetrzymanie w 52°C przez 15 min	24	(18)
	bez adaptacji termicznej	4,3	
	przetrzymanie w 0,3 M NaCl przez 30 min	33,5	
	bez zabiegu adaptacji osmotycznej	8,3	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	dodatek natywnej skrobi ziemniaczanej	31	(15)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	bez dodatków	4,3	(24)
	1 M NaCl w pożywce podczas hodowli	11,7	
	2 mM betainy w pożywce podczas hodowli	1,9	
	1 M NaCl i 2 mM betainy w pożywce podczas hodowli	26	
<i>Lactobacillus pseudoplantarum</i>	maltodekstryna + laktoza	14,7	(16)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	maltodekstryna + laktoza	2,95	(16)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	suszenie w roztworze odtłuszczonego mleka w proszku	18	(15)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	suszenie w roztworze odtłuszczonego mleka w proszku	53-63	(15)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	(brak danych)	22	(15)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>thermophilus</i>	(brak danych)	45	(15)

1	2	3	4
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>thermophilus</i>	suszenie w jogurcie; temperatura wylotowa 60°C	69,5	(17)
	suszenie w jogurcie; temperatura wylotowa 75°C	51,6	
<i>Bifidobacterium longum</i>	suszenie w 10% roztworze odtuszczonego mleka	82,6	(19)
	suszenie w 10% roztworze gumy arabskiej	41	
	suszenie w 10% roztworze skrobi rozpuszczalnej	29	
	suszenie w 10% roztworze żelatyny	63,7	
<i>Bifidobacterium infantis</i>	suszenie w 10% roztworze odtuszczonego mleka	16	(19)
	suszenie w 10% roztworze gumy arabskiej	2,15	
	suszenie w 10% roztworze skrobi rozpuszczalnej	0,92	
	suszenie w 10% roztworze żelatyny	1,3	

Zabiegiem wykorzystywanym w próbach zwiększenia przeżywalności komórek podczas suszenia rozpyłowego jest również szok termiczny poprzedzający suszenie. W badaniach prowadzonych przez Teixeirę i in. (6) komórki przetrzymano przez 30 min w temperaturze 50°C (optymalna temperatura wzrostu szczepu wynosiła 37°C). Stwierdzono statystycznie istotny wpływ tego zabiegu na przeżywalność suszonych rozpyłowo komórek bakterii znajdujących się w logarytmicznej fazie wzrostu. Jednocześnie nie zaobserwowano wpływu tego zabiegu na przeżywalność komórek w stacjonarnej fazie wzrostu. Należy jednak zaznaczyć, że komórki bakterii w stacjonarnej fazie wzrostu już w próbie kontrolnej wykazywały przeżywalność wyższą niż komórki suszone w logarytmicznej fazie wzrostu po poddaniu szokowi termicznemu (6). W innych badaniach, w których wykorzystano szczep *Lactobacillus paracasei*, zabieg adaptacji termicznej, polegający na przetrzymaniu w podwyższonej temperaturze w odtuszczonej mleku, spowodował 700-krotny wzrost termotolerancji i 18-krotny wzrost przeżywalności podczas suszenia (18). Przykłady te potwierdzają, że bakterie aktywnie reagują na zmiany w otoczeniu, zmieniając swój metabolizm tak, by zwiększyć oporność (31). Wzbudzenie oporności może być związane z aktywacją systemów, które można zaliczyć do dwóch kategorii. Pierwsza dotyczy specyficznych systemów indukowanych subletalną dawką chemicznego lub fizycznego czynnika stresowego, pozwalających przetrwać późniejsze oddziaływanie większych dawek tego samego czynnika. Druga kategoria obejmuje systemy pozwalające komórce znieść liczne stropy środowiskowe, przy czym aktywacja tych systemów nie wymaga wcześniejszej ekspozycji na dany czynnik stresowy (31-33). W wielu przypadkach trudno jednoznacznie stwierdzić, który z systemów bierze udział w ochronie komórki, zwłaszcza, jeżeli na komórkę oddziałuje cały zespół czynników stresowych, jak ma to miejsce przy suszeniu rozpyłowym. Przeprowadzone badania pozwalają jednak przypuszczać, że istnieje wiele możliwości poprawy przeżywalności bakterii podczas suszenia.

W celu zwiększenia stabilności kultur w czasie ich przechowywania stosuje się również dodatki kwasu askorbinowego i glutaminianu sodu. Substancje te pełnią rolę przeciwutleniaczy i absorbentów tlenu (7).

Prowadzone były także badania mające za zadanie określenie optymalnych warunków rehydratacji suszonych preparatów. Porównując wpływ odtłuszczonego mleka, pożywki MRS (od nazwisk twórców: de Mann, Rogosa, Sharp), wody dejonizowanej i buforu fosforanowego na przeżywalność uwadnianych komórek, nie stwierdzono znaczących różnic w przeżywalności. Istotne różnice stwierdzono jednak w zależności od szybkości rehydratacji oraz temperatury prowadzenia tego procesu (6,18). Sugeruje się, że ma to związek z szokiem osmotycznym mającym miejsce podczas rehydratacji i mogącym znacznie zmniejszać przeżywalność komórek.

Potwierdzono również, że zwiększenie koncentracji kultur poddawanych suszeniu może powodować wzrost przeżywalności (2). W celu poprawienia przeżywalności prowadzono poza tym suszenie w roztworach odtłuszczonego mleka oraz serwatki. Nie zanotowano jednak znaczących różnic między wartościami przeżywalności uzyskanymi po zastosowaniu wspomnianych substancji ochronnych (9). Jednocześnie nie zaobserwowano negatywnego wpływu suszenia rozpyłowego na produktywność metabolitów, takich jak kwas mlekowy oraz bakteriocyny. Peptydy bakteriocynowe zachowywały przy tym wysoką, niezmienną aktywność rzędu 32 000 jednostek aktywności/g bakteriocyny, oznaczaną wobec szczepu wskaźnikowego *Bacillus coagulans* (2). Autorzy obserwowali zarazem liniowy spadek przeżywalności szczepu *Lactobacillus paracasei* wraz ze wzrostem temperatury wylotowej. Przeżywalność ta z ponad 90% w temperaturze 70-75°C, spadła do zaledwie kilku procent w temperaturze 100-105°C, osiągając wartość zerową w temperaturze 120°C (2). Podobne wyniki, potwierdzające wysoką aktywność bakteriocyn w suszonych preparatach, uzyskano również w innych opisanych badaniach (1,9). Udało się to potwierdzić zarówno metodą krytycznych rozcieńczeń w zawiesinach uwodnionych preparatów poddanych inkubacji, jak i oznaczając zdolność do produkcji bakteriocyn, dla poszczególnych kolonii wyizolowanych z hodowli płytkowych bakterii pochodzących z suszonych preparatów (9).

Ważnym parametrem jest także kinetyka wzrostu komórek w hodowlach zaszczipianych suszonymi preparatami. Jeśli chodzi o długość fazy adaptacyjnej (tzw. lagfazy), niektórzy autorzy dowodzą, że nie uległa ona wydłużeniu (2), podczas gdy w innych przypadkach wydłużenie fazy adaptacyjnej było wyraźnie widoczne (9). W opisywanych pracach nie zaobserwowano istotnych zmian w przebiegu fazy logarytmicznej. Jedynie dla *Lactococcus lactis* odnotowano obniżenie maksymalnej koncentracji komórek osiąganą przez populację (9).

Najczęściej zwraca się jednak uwagę na fakt, że utrzymanie wysokiej przeżywalności związane jest z koniecznością przechowywania preparatów w warunkach chłodniczych (temp 4°C) (1,2,7,34). Niestety, nawet przy przechowywaniu suszonych kultur w temperaturze 4°C, po upływie 2 miesięcy obserwowano już znaczny spadek ich przeżywalności (9). Istnieją dowody wskazujące, że zastosowanie przeciw-

utleniający i absorbentów tlenu działało szkodliwie na stabilność kultur podczas przechowywania. Miało to jednak miejsce jedynie w temperaturze 20°C, natomiast w niższych temperaturach dodatki te poprawiały przeżywalność komórek (7). Również odtłuszczone mleko, którego dodatek może zwiększać przeżywalność bakterii w procesie suszenia, działa korzystnie w trakcie przechowywania, poprawiając stabilność preparatów (2).

Poza temperaturą, istotny wpływ na stabilność suszonych preparatów podczas przechowywania ma aktywność wody (a_w), choć nie jest to zależność liniowa. W badaniach prowadzonych nad wpływem tego parametru wykazano najlepszą przeżywalność przy $a_w = 0,11$ (7). Należy jednak pamiętać, że w zależności od składu chemicznego suszonego preparatu, zawartość wody odpowiadająca wspomnianej wartości a_w może być różna (35). Brak niestety jednoznacznych danych określających końcową zawartość wody w preparatach. W różnych źródłach podaje się zakres tego parametru od 2 do 10%. Nie zawsze jest brany pod uwagę również wpływ wilgotności na stabilność preparatów podczas przechowywania. Można jednak stwierdzić, że większość autorów uwzględniających aspekt stabilności podczas przechowywania, określa optymalną końcową zawartość wody na $\leq 4\%$ (2,6,18,19).

5. Podsumowanie

Przybliżono kierunki badań nad suszeniem rozpyłowym oraz perspektywy zastosowania tej metody do wytwarzania na szeroką skalę preparatów zawierających żywe komórki bakterii mlekowych. Przykłady badań prowadzonych na świecie świadczą o dużym zainteresowaniu tym problemem. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że metoda ta ma znaczny potencjał aplikacyjny. W przypadku wielu szczepów udało się uzyskać wysoką przeżywalność, porównywalną z próbami liofilizowanymi. Możliwe jest również utrzymanie na odpowiednim poziomie parametrów takich jak długość fazy adaptacyjnej czy produkcja metabolitów, takich jak kwas mlekowy. Na ogół podczas suszenia nie ulegają pogorszeniu również właściwości probiotyczne szczepów, np. aktywność antagonistyczna wobec patogenów, związana z produkcją bakteriocyn przez bakterie mlekowe. Dobre rezultaty daje zastosowanie nośników oraz substancji ochronnych. Niestety, w większości opisanych badań zastosowanie zabiegów adaptacyjnych, takich jak przetrzymanie w podwyższonej temperaturze czy oddziaływanie podwyższonym ciśnieniem osmotycznym, wpływało na wzrost przeżywalności jedynie, wtedy gdy komórki znajdowały się w logarytmicznej fazie wzrostu.

Literatura:

1. Silva J., Carvalho A. S., Teixeira P., Gibbs P. A., (2002), *Let. Appl. Microbiol.*, 34, 77-81.
2. Gardiner G. E., O'Sullivan E., Kelly Y., Auty M. A. E., Fitzgerald G. F., Collins Y. K., Ross R. P., Stanton C., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2605-2612.

3. Teixeira P., Castro H., Kirby R., (1995), *J. Food Protect.*, 8, 934-936.
4. Witrowsa-Rajchert D., Samborska K., (2002), *Żywność*, 2, 5-15.
5. Knorr D., (1998), *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 295-306.
6. Teixeira P., Castro H., Kirby R., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 456-462.
7. Teixeira P. C., Castro M. H., Malcata F. X., Kirby R., (1995), *J. Dairy Sci.*, 78, 1025-1031.
8. Kim S. S., Bhowmik S. R., (1990), *J. Food Sci.*, 55, 1008-1010.
9. Mauriello G., Aponte M., Andolfi R., Moschetti G., Villiani F., (1999), *J. Food Protect.*, 7, 773-777.
10. Buffo R. A., Probst K., Zehentbauer G., Luo Z., Reineccius G. A., (2002), *Flavour Fragr. J.*, 17, 292-299.
11. Tutowa E. G., Kuc P. S., (1991), *Suszenie produktów biosyntezy*, WNT, Warszawa.
12. Linders L. J. M., de Jong G. I. W., Meerdink G., van't Riet K., (1997), *J. Food Eng.*, 31, 237-250.
13. Kets E. P. W., de Bont J. A. M., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 116, 251-256.
14. Lievens L. C., Verbeek M. A. M., Noomen A., van't Riet K., (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 90-94.
15. Lievens L. C., van't Riet K., (1993), *Convective drying of bacteria – the drying processes*, Ed. A. Fiechter, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 45-63.
16. To B. C. S., Etzel M. R., (1997), *J. Food Sci.*, 62, 576-578, 585.
17. Bielecka M., Majkowska A., (2000), *Nahrung/Food*, 44, 257-262.
18. Desmond C., Stanton C., Fitzgerald G. F., Collins K., Ross P. R., (2001), *Int. Dairy J.*, 11, 801-808.
19. Lian W. C., Hsiao H. C., Chou C. C., (2002), *Int. J. Food Microbiol.*, 74, 79-86.
20. Bielecka M., Majkowska A., (1998), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2, 267-274.
21. Boyaval P., Deborde C., Corre C., Blanco C., Begue E., (1999), *Lait*, 79, 59-69.
22. Csonka L. N., Epstein W., (1996), *Osmoregulation*, Eds. Neidhardt F. C., Curtiss III R., Ingraham J. L., Lin E. C. C., Low K. B., Magasanik B., Reznokoff W. S., Riley M., Schaechter M., Umberger H. E., ASM Press, Washington, D.C., 1210-1223.
23. Kets E. P. W., Galinski E. A., de Bont J. A. M., (1994), *Arch. Microbiol.*, 162, 243-248.
24. Kets E. P. W., Teunissen P. J. M., de Bont J. A. M., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 1, 259-261.
25. Bremer E., Krämer R., (2000), *Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria*, Ed. Storz G, Hengge-Aronis R., ASM Press, Washington, D.C., rozdz. 6, 79-97.
26. Galinski E. A., (1995), *Adv. Microbial. Physiol.*, 37, 273-328.
27. Csonka L. N., (1989), *Microbiol. Rev.*, 53, 121-147.
28. Lippert K., Galinski E. A., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 61-65.
29. Fletcher S. A., Csonka L. N., (1998), *Food Microbiol.*, 15, 307-317.
30. Ko R., Smith L. T., Smith G. M., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 426-431.
31. Pichereau V., Hartke A., Auffray Y., (2000), *Int. J. Food Microbiol.*, 55, 19-25.
32. Glaasker E., Tjan F. S. B., ter Steeg P. F., Konings W. N., Poolman B., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 411-428.
33. Teixeira P., Castro H., Kirby R., (1994), *Lett. Appl. Microbiol.*, 18, 218-221.
34. Johnson J. A. C., Etzel M. R., (1993), *Inactivation of lactic acid bacteria during spray drying*, Eds. G. V. Barbosa-Canovas, Okos M. R., Food dehydration, Institute of Chemical Engineering, New York, N.Y., 98-107.
35. Champagane C. P., Mondou F., Raymond Y., Roy D., (1996), *Food Res. Int.*, 29, 555-562.