

Marek HENCZKA, Małgorzata DJAS

e-mail: m.henczka@ichip.pw.edu.pl

Zakład Inżynierii i Dynamiki Reaktorów Chemicznych, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Zintegrowana metoda dezintegracji mikroorganizmów w cieczach o podwyższonej lepkości

Wstęp

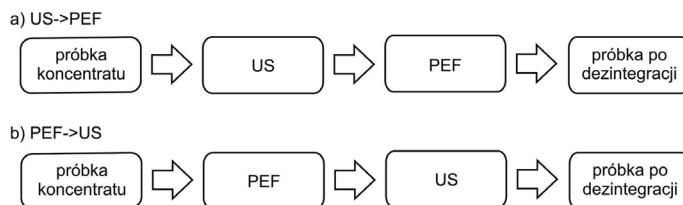
Obecność form przetrwalnikowych bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris* w koncentraty owocowych stanowi istotny problem dla zakładów produkcyjnych przemysłu owocowo-warzywnego. Występowanie tych mikroorganizmów w koncentraty jest efektem zakażeń wtórnych, do których dochodzi podczas składowania koncentratów w niehermetyzowanych zbiornikach magazynowych. Skażony koncentrat owocowy jest produktem niepełnowartościowym o obniżonej wartości rynkowej, zaś produkty metabolizmu bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris* powodują obniżenie jakości wyrobów gotowych (soków i napojów owocowych). Powoduje to konieczność poszukiwania efektywnych metod dezintegracji form przetrwalnikowych mikroorganizmów obecnych w koncentraty soków owocowych.

Termoacidofilna charakterystyka bakterii *A. acidoterrestris* jest przyczyną ich odporności wobec procesu pasteryzacji [1]. Proces obróbki termicznej może zniszczyć formy wegetatywne, jednak nie powoduje całkowitej eliminacji termoodpornych spor. Powszechnie stosowaną metodą przemysłową usuwania skażeń wtórnych z produktów jest filtracja aseptyczna. Jednak ze względu na wysoką lepkość koncentraty rozwiązanie to cechuje mała wydajność i duże zużycie energii.

Alternatywnymi metodami eliminacji mikroorganizmów są zastosowanie prądu elektrycznego (PEF) i ultradźwięków (US). W przypadku dezintegracji ultradźwiękowej głównym czynnikiem destrukcyjnym wobec mikroorganizmów jest zjawisko kawitacji akustycznej, natomiast w metodzie PEF zjawisko elektroporacji. W wyniku przeprowadzonych badań doświadczalnych wykazano jednak, że przy zastosowaniu prądu elektrycznego i ultradźwięków jako pojedynczych metod eliminacji form przetrwalnikowych w roztworach ciekłych uzyskuje się niezadowalająco niską efektywność procesu [2–4]. W celu zwiększenia tej efektywności w niniejszej pracy proponuje się połączenie obu sposobów eliminacji jako zintegrowaną metodę dezintegracji mikroorganizmów, którą można stosować także dla cieczy o podwyższonej lepkości. Dodatkową zaletą prezentowanej metody jest możliwość jej zastosowania w warunkach przemysłowej jako proces ciągły. W pracy zbadano wpływ warunków prowadzenia procesu, jak również kolejności zastosowania obu metod na przeżywalność mikroorganizmów. Ponadto uzyskane wyniki umożliwiają identyfikację elementarnych mechanizmów dezintegracji mikroorganizmów na skutek połączonego oddziaływania prądu elektrycznego i fal ultradźwiękowych.

Badania doświadczalne

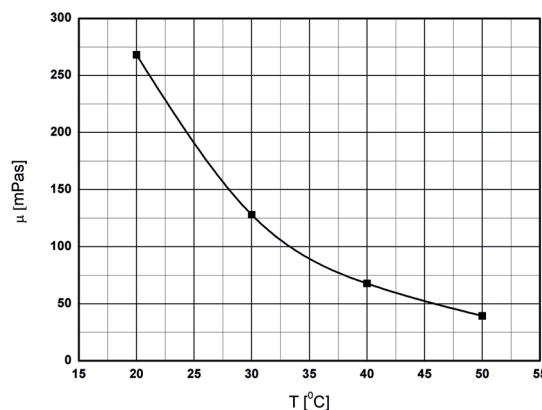
Medium modelowym w przeprowadzonych badaniach był koncentrat jabłkowy zawierający formy przetrwalnikowe *A. acidoterrestris*. Badania wykonano przy stałej mocy (0,33 kW) oraz czasie oddziaływania fal ultradźwiękowych wynoszącym 10 min. Wartości te zostały ograniczone ze względu na konieczność ograniczenia niepożądanego wzrostu temperatury koncentraty. Dezintegrację z zastosowaniem impulsów elektrycznych przeprowadzono przy różnych wartościach natężeń pola elektrycznego (500 V/cm, 833,3 V/cm, 2500 V/cm) i ilości impulsów elektrycznych (500 i 2000 impulsów). Napięcie impulsu elektrycznego wynosiło 250 V, czas trwania impulsu to 2000 μ s, a przerwa pomiędzy impulsami trwała 2 s. Badania przeprowadzono przy zastosowaniu dwóch możliwych sekwencji obu metod eliminacji mikroorganizmów, co przedstawiono schematycznie na rys. 1. W pierwszym wariantcie ciecz była najpierw poddawana oddziaływaniu ultradźwięków, a następnie prądu elektrycznego. W drugim wariantcie kolejność ta była odwrotna.



Rys. 1. Schemat przeprowadzonych badań eliminacji spor *A. acidoterrestris* z koncentratu soku jabłkowego

Wyniki badań doświadczalnych

Na rys. 2 przedstawiono wyznaczoną doświadczalnie zależność lepkości koncentraty jabłkowej od temperatury. Ze względów technologicznych wymagane jest, aby temperatura koncentraty podczas procesu usuwania mikroorganizmów nie przekraczała 30°C. W tych warunkach koncentrat wykazuje lepkość o dwa rzędy wyższą od lepkości wody, co w znacznym stopniu utrudnia zastosowanie klasycznego procesu separacji przy użyciu filtrów ceramicznych.



Rys. 2. Zależność lepkości dynamicznej koncentratu soku jabłkowego od temperatury

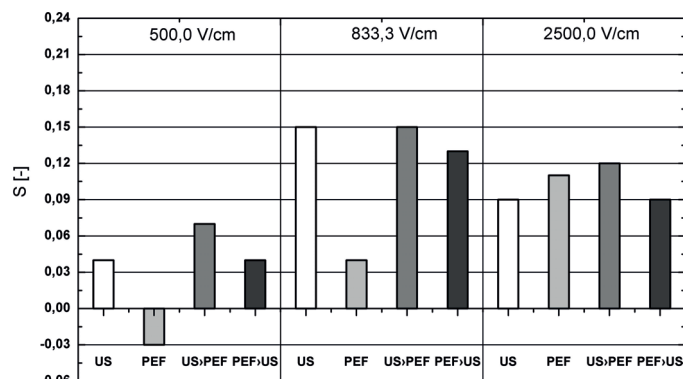
Jako miarę stopnia inaktywacji mikroorganizmów zdefiniowano parametr S w postaci

$$S = \log \frac{N_0}{N}, \quad (1)$$

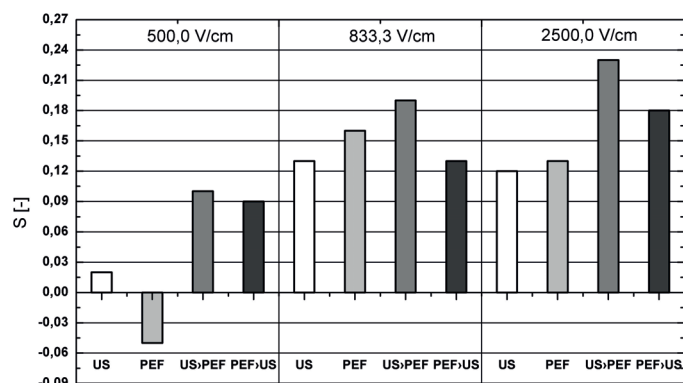
gdzie N_0 oznacza początkową liczbę kolonii, w próbce nie poddanej inaktywacji [CFU/ml], zaś N – liczbę kolonii w próbce po procesie inaktywacji [CFU/ml]. Na rys. 3 i 4 przedstawiono szczegółowe wyniki badań doświadczalnych.

Analiza wyników badań doświadczalnych

Analiza uzyskanych wyników badań doświadczalnych pozwala stwierdzić, że połączenie oddziaływania fal ultradźwiękowych oraz prądu elektrycznego umożliwia częściową eliminację form przetrwalnikowych *A. acidoterrestris* z koncentratu soku jabłkowego. Należy jednak zauważyć, iż większą efektywność inaktywacji mikroorganizmów uzyskano poddając koncentrat w pierwszej kolejności oddziaływaniu fal ultradźwiękowych, a następnie prądu elektrycznego (US→PEF). Najwyższy stopień inaktywacji bakterii *A. acidoterrestris* uzyskano w wyniku zastosowania połączenia metod US→PEF dla 2000 impulsów i największego natężenia pola elektrycznego o wartości 2500 V/cm



Rys. 3. Stopień inaktywacji bakterii *A. acidoterrestis* dla różnych natężeń pola elektrycznego i sekwencji metod przy zastosowaniu 500 impulsów elektrycznych



Rys. 4. Stopień inaktywacji bakterii *A. acidoterrestis* dla różnych natężeń pola elektrycznego i sekwencji metod przy zastosowaniu 2000 impulsów elektrycznych

(Rys. 3). Wyniki uzyskane dla 2000 impulsów elektrycznych (Rys. 4) pozwalają stwierdzić, że wraz ze wzrostem natężenia pola elektrycznego rośnie stopień inaktywacji *A. acidoterrestis* uzyskany w wyniku zastosowania zarówno metody US→PEF, jak również PEF→US. Ponadto zwiększenie liczby impulsów z 500 do 2000 przy zastosowaniu pola elektrycznego o wartości 2500 V/cm (Rys. 3 i 4) pozwala na około 2-krotne zwiększenie stopnia inaktywacji uzyskanego w wyniku połączenia metod w dowolnej kolejności. Taki sam efekt można uzyskać poprzez zwiększenie natężenia pola elektrycznego z 500 V/cm do 2500 V/cm przy zachowaniu liczby 2000 impulsów.

Stopień inaktywacji uzyskany w wyniku zastosowania metody US→PEF niezależnie od generowanego natężenia pola elektrycznego, jak i liczby impulsów elektrycznych, zawsze był równy bądź większy w porównaniu do stopnia inaktywacji po zastosowaniu pojedynczych metod- US lub PEF, przy zachowaniu tych samych parametrów procesu. Skuteczność tej metody inaktywacji wynika z połączenia dwóch różnych mechanizmów oddziaływania ultradźwięków i impulsów pola elektrycznego na komórki bakteryjne.

Większą efektywność procesu uzyskiwaną przy zastosowaniu kolejności metod US→PEF można interpretować w następujący sposób. Na mechanizm dezintegracji ultradźwiękowej mikroorganizmów składają się dwa efekty. Pierwszym z nich jest rozbijanie agregatów na pojedyncze komórki, drugi to niszczenie komórek znajdujących się w zawiesinie. Końcowy rezultat inaktywacji bakterii za pomocą ultradźwięków jest wynikiem konkurencji pomiędzy dwoma opisanymi efektami. Dominującym efektem podczas prowadzenia badań było rozbijanie agregatów komórkowych bakterii *A. acidoterrestis*, a następnie częściowa inaktywacja pojedynczych komórek.

Mechanizm eliminacji mikroorganizmów za pomocą impulsów prądu elektrycznego oparty jest głównie na teorii elektroporacji dotyczącej formowania się porów w błonie komórkowej w wyniku działania pola elektrycznego o dużym napięciu. Prowadzi to do zmian w transporcie jonowym, pęcznienia komórki i jej zniszczenia.

Efekt synergii uzyskany podczas zastosowania metody US→PEF polega na rozbijaniu agregatów komórkowych za pomocą fal ultradźwiękowych, a następnie oddziaływaniu impulsów elektrycznych na

odsłonięte komórki bakteryjne. Dlatego w przypadku inaktywacji z zastosowaniem tej sekwencji stopień inaktywacji mikroorganizmów jest wyższy niż w wyniku eliminacji za pomocą pojedynczej metody, w której drobnoustroje niszczone są przez działanie jednego mechanizmu.

Dodatkowo podczas prowadzenia procesu mogą zachodzić zmiany strukturalne w komórkach. W wyniku oddziaływania fal ultradźwiękowych następuje mechaniczne uszkodzenie płaszcza ochronnego przetrwalników, gdyż w chwili przejścia fali ultradźwiękowej przez ośrodek ciekły powstają regiony o bardzo wysokich wartościach temperatur i ciśnień. Wzrost temperatury koncentratu podczas sonikacji oraz lokalne wysokie wartości ciśnienia wywołują również przejście części spor w formy wegetatywne, które to formy są mniej odporne na procesy inaktywacji. Płaszcz ochronny i kora otaczająca rdzeń przetrwalnika uniemożliwiają działanie pola elektrycznego. Przetrwalniki o częściowo zniszczonej strukturze podczas dezintegracji ultradźwiękowej, jak również przetrwalniki przekształcone w formy wegetatywne poddane w drugiej kolejności oddziaływaniu impulsów elektrycznych łatwiej ulegają zniszczeniu. Również zniszczenie samego płaszcza ochronnego przetrwalników ułatwia destrukcyjne działanie pola elektrycznego. Ponadto formy wegetatywne powstałe w wyniku przekształcenia przetrwalników podczas dezintegracji ultradźwiękowej są mniej odporne wobec letalnego działania metody PEF niż formy przetrwalnikowe. Wszystkie opisane czynniki powodują zwiększenie efektu inaktywacji spor *A. acidoterrestis* za pomocą metody US→PEF w porównaniu z zastosowaniem pojedynczych technik eliminacji.

Zastosowanie połączenia metod w kolejności oddziaływanie prądu elektrycznego, a następnie fal ultradźwiękowych (PEF→US) jest mniej efektywne w eliminacji *A. acidoterrestis* w porównaniu do metody US→PEF dla wszystkich badanych natężeń pola elektrycznego oraz liczby impulsów. Należy przy tym zauważyć, że często stopień inaktywacji uzyskany po zastosowaniu sekwencji PEF→US zbliżony jest do stopnia inaktywacji otrzymanego po zastosowaniu jedynie ultradźwięków. Dlatego też stosowanie tej sekwencji oddziaływań w praktyce nie jest uzasadnione.

Wynika to z faktu, iż podczas oddziaływania prądu elektrycznego destrukcji ulegają pojedyncze komórki bakteryjne, natomiast w mniejszym stopniu zachodzi deagregacja ich skupisk (ujemne wartości parametru S obrazują efekt rozbijania agregatów i wzrostu liczby kolonii w układzie). Następnie w wyniku oddziaływania fal ultradźwiękowych następuje rozbijanie zawartych w cieczy skupisk bakterii i jednocześnie wzrasta liczba kolonii. Efekt końcowy procesu zależy od ilości agregatów i dominującego w danym przypadku mechanizmu oddziaływania fal ultradźwiękowych – deagregacji lub destrukcji komórek.

Wnioski

Wykazano znaczną efektywność zastosowania kolejnego oddziaływania procesów dezintegracji mikroorganizmów w sekwencji US→PEF w eliminacji spor *A. acidoterrestis* z koncentratu soku jabłkowego. Stwierdzono także, że przy zastosowaniu odwrotnej sekwencji metod usuwania mikroorganizmów uzyskuje się efekt zbliżony do zastosowania metody pojedynczej. Do zalet przedstawionej metody należy możliwość zastosowania jej w skali przemysłowej dla cieczy o podwyższonej lepkości. Natomiast istotną wadą tej metody jest niekorzystny wzrost temperatury cieczy podczas dezintegracji ultradźwiękowej. Może on powodować niepożądaną zmianę barwy i smaku oraz utratę składników odżywczych koncentratu. W zastosowaniach praktycznych konieczne jest zatem zastosowanie układu chłodzącego przetwarzany koncentrat. Ponadto, uzyskane wyniki umożliwiły identyfikację elementarnych mechanizmów dezintegracji mikroorganizmów na skutek połączonego oddziaływania prądu elektrycznego i fal ultradźwiękowych.

LITERATURA

- [1] S.-S. Chang, D.-H. Kang: Critical Reviews in Microbiology, **30**, 55 (2004).
- [2] K.A.J. Borthwick, T.E. Love, M. B. McDonnell, W.T. Coakley: Anal. Chem. **77**, 7242 (2005).
- [3] T. Grahl, H. Märkl: Appl. Microbiol. Biotechnol. **45**, 148 (1996).
- [4] Zs. Cserhalmi, I. Vidács, J. Beczner, B. Czukor: Innovative Food Science & Emerging Technologies **3**, 41 (2002).