

# Niedertemperaturgranulierung von Mikroorganismen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktoringenieurin  
(Dr.-Ing.)**

von Dipl.-Ing. Magdalena Wassermann  
geb. am 05.08.1984 in Magdeburg

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission	Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl (Vorsitz)
	Prof. Dr.-Ing. habil. Evangelos Tsotsas (Gutachter)
	Prof. Dr. rer. nat. Christiana Cordes (Gutachter)
	Prof. Dr.-Ing. Mirko Peglow (Gutachter)

eingereicht am:	05.09.2014
Promotionskolloquium am:	08.04.2015

# Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Niedertemperaturgranulierung von prokaryotischen Mikroorganismen. Als Modellorganismus wird der Milchsäurebakterienstamm *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* DSMZ 20174T verwendet. Dieser wird bei unterschiedlichen Prozessbedingungen unter Einsatz von diversen Trägermaterialien getrocknet. Untersucht wird der Einfluss der Trocknung auf die Überlebensrate und die Lagerstabilität der Bakterien. Dabei wurde herausgefunden, dass mit kleiner werdender Trocknungszeit und der Verwendung des Trägermaterials Maltodextrin hohe Viabilitäten nach der Trocknung erreicht werden. Bei einer Eindüsungzeit von 20 bzw. 30 Minuten und einer jeweiligen zehnminütigen Nachtrocknungszeit konnten Überlebensraten zwischen 28 und 64 % ermittelt werden. Desweiteren war die Untersuchung der Wirkung von Schutzstoffen auf die Viabilität nach der Trocknung und während der Lagerung Bestandteil der Arbeit. Dafür kamen die Zellschutzstoffe Trehalose und Sorbitol zum Einsatz. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die jeweiligen Schutzstoffe keinen Einfluss auf die Viabilität nach der Trocknung nach sich ziehen, sich jedoch durch die Verwendung die Lagerstabilität bei Raumtemperatur verbessert. Dabei konnten Zellkonzentrationen im Bereich zwischen  $10^7$  und  $10^9$  KBE/g Granulat nach einer sechsmonatigen Lagerung bei Raumtemperatur ermittelt werden. Zur Untersuchung der Lagerstabilität wurden die Bakterien jeweils bei 4 °C und Raumtemperatur in geschlossenen Glasflaschen über sechs Monate gelagert. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses veränderter Kultivierungsbedingungen auf die Viabilität von *L. plantarum* nach der Trocknung und Lagerung. Dafür wurden Bakterien aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen in der Wirbelschicht getrocknet. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass durch die pH-Wert-Regelung höhere Viabilitäten erreicht wurden, jedoch die Lebendzellzahl während der Lagerung stärker abnahm. Zusätzlich wurde im Rahmen der Arbeit der Viabilitätsverlust von *L. plantarum* während der Wirbelschichttrocknung mit Hilfe eines gekoppelten Wirbelschichttrocknungs- und Inaktivierungsmodelles beschrieben. Hierbei finden die Wärme- und Stoffübergänge in der Wirbelschicht Berücksichtigung. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die für *L. plantarum* formulierten Prozessbedingungen für die Wirbelschichttrocknung problemlos auf einen weiteren Bakterienstamm *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DG-CC 2132 übertragen werden können. Nach der Trocknung von *L. paracasei* konnten dabei Viabilitäten von 48 % erreicht werden. Außerdem wurde untersucht, welche Auswirkung höhere Schutzstoffkonzentrationen von Sorbitol auf die Viabilität nach der Trocknung und Lagerung mit sich bringen. In diesem Zusammenhang wurde die höchste Viabilität bei den Zellen erreicht, die ohne Schutzstoff getrocknet wurden. Vielmehr wurde ein gegenläufiger Effekt beobachtet, dass mit zunehmender Sorbitolkonzentration die Lebendzellzahl nach der Trocknung sukzessiv abnahm.

# Summary

The application of lactic acid bacteria has an economic significance as probiotic and conserving additives for food industry. Therefore a crucial point in the commercialization of lactic acid bacteria is the development of a storable culture which retains the viability of the primary culture. For preserving bioactive materials freeze and spray drying are established methods. Freeze drying is a gentle but long term and expensive method which is uneconomical. The benefit of spray drying is the formation of free flowing particles in a short time but it is disadvantageous that the required high temperatures reduce the viability of mesophilic microorganisms. The fluidized bed drying technology is an alternative, gentle and cost saving method for the preservation of microorganisms. The present thesis analyses the influence of low temperature fluidized bed drying processes on cell viability and storage stability of the procaryotic microorganism *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* DSMZ 20174T. Therefore were tested different process parameters and carrier materials. The studies have shown that the reduction of the time of drying and the usage of maltodextrin as a carrier have provided the best results for *L.plantarum*. Viabilities between 28 and 64 % were achieved after 30 minutes drying. Furthermore different protective materials, such as trehalose and sorbitol, were investigated for their protecting ability during fluidized bed drying and the storage. For the storage experiments the granulated microorganisms were stored at 4 °C and room temperature in closed glas bottles for six months. The usage of protective materials has not affected the viability after the drying process. The extent of viability was the same as in case of drying without protective materials. Rather the addition improved the storage ability at room temperature. After six months of storing the cell concentration had the same amount like at the beginning of the experiments. It was between  $10^7$  and  $10^9$  CFU/g granulate. Another aspect in this thesis was the determination of the influence of different fermentation conditions on the viability after the drying process. Therefore were dried pH-regulated and not pH-regulated fermented cells. The investigation indicated a higher viability of the pH-regulated cells after the drying process but a stronger decrease of the viable cells during the storage. Additionally a model was developed which predicted the lost of viability during a drying process in consideration of heat and mass transfer in the fluidized bed. Another question in this thesis was the verification of the transferability of the process parameters to another lactic acid bacterium. Therefore *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DGCC 2132 was dried with and without different sorbitol concentrations in the fluidized bed. The experiments have shown a viability of 48 % without using sorbitol and that the usage of sorbitol had no positive effect on the viability after drying. On the contrary an increasing sorbitol concentration resulted in a decreasing viability.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b>	<b>I</b>
<b>Abstract</b>	<b>II</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XII</b>
<b>Symbolverzeichnis</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Allgemeines . . . . .	1
1.2 Stand des Wissens . . . . .	3
1.3 Motivation und Zielstellung . . . . .	5
<b>2 Theoretische Betrachtung</b>	<b>6</b>
2.1 Einfluss der Fermentation auf die Viabilität von Mikroorganismen . . . . .	8
2.1.1 Morphologie und Aufbau . . . . .	9
2.1.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> . . . . .	10
2.1.3 <i>Lactobacillus paracasei</i> . . . . .	13
2.2 Einfluss der Trocknung auf die Viabilität . . . . .	13
2.2.1 Trocknung allgemein . . . . .	14
2.2.2 Phasenübergang der Membran . . . . .	18
2.2.3 Einfluss von Trägermaterialien . . . . .	19
2.2.4 Einfluss von Schutzstoffen . . . . .	20
2.2.5 Wirbelschichttrocknung . . . . .	23
2.3 Einfluss der Lagerung auf die Viabilität . . . . .	25
2.3.1 Glaszustand . . . . .	26
2.3.2 Wasseraktivität . . . . .	31
2.3.3 Sorptionsisotherme . . . . .	32
2.3.4 Zustandsdiagramme . . . . .	36
<b>3 Experimentelle Untersuchungen</b>	<b>37</b>
3.1 Arbeitslösungen und Puffer . . . . .	37

3.2	Ablauf der Untersuchungen . . . . .	37
3.3	Bakterienstämme . . . . .	38
3.4	Kultivierung . . . . .	39
3.4.1	Medium . . . . .	39
3.4.2	Inokulum . . . . .	40
3.4.3	Kultivierung im Schüttelkolben . . . . .	41
3.4.4	Kultivierung im 2 l Bioreaktor . . . . .	42
3.4.5	Kultivierung von <i>L.paracasei</i> . . . . .	44
3.4.6	Analytik . . . . .	44
3.5	Niedertemperaturgranulierung . . . . .	47
3.5.1	Versuchsreihen . . . . .	47
3.5.2	Anlage . . . . .	50
3.5.3	Versuchsdurchführung . . . . .	53
3.5.4	Lagerung . . . . .	54
3.5.5	Analytik . . . . .	55
3.6	Statistik . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Modellierung und Bilanzierung</b>	<b>61</b>
4.1	Wirbelschichttrocknungsmodell . . . . .	63
4.1.1	Modellannahmen . . . . .	63
4.1.2	Bilanzierung . . . . .	64
4.1.3	Kinetiken . . . . .	67
4.2	Inaktivierungsmodell . . . . .	68
4.2.1	Modellannahmen . . . . .	68
4.2.2	Kinetiken . . . . .	69
4.3	Lösung mathematischer Bilanzgleichungen . . . . .	70
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>72</b>
5.1	Fermentation . . . . .	72
5.1.1	Kultivierung im Schüttelkolben . . . . .	73
5.1.2	Kultivierung im 2 l Bioreaktor . . . . .	73
5.2	Einfluss der Trocknung auf die Viabilität . . . . .	76
5.2.1	Niedertemperaturgranulierung . . . . .	76
5.2.2	Variation der Verweilzeiten, Trägermaterialien und Schutzstoffe . . . . .	82
5.2.3	Zusammenfassung der Trocknungsergebnisse . . . . .	87
5.3	Vergleich Experiment und Simulation . . . . .	91
5.4	Einfluss der Lagerung auf die Viabilität . . . . .	98
5.4.1	Einfluss von Trocknungsbedingungen, Lagerungstemperaturen und Umgebungsfeuchten auf die Lagerstabilität . . . . .	99

5.4.2	Zusammenhang zwischen Wasseraktivität und Inaktivierungskonstante . . . . .	118
5.4.3	Zusammenhang zwischen Wassergehalt und Inaktivierungskonstante	120
5.4.4	Vergleich Inaktivierungskonstante Trocknung und Lagerung . . . . .	121
5.4.5	Sorptionsisothermen . . . . .	123
5.4.6	Glasübergangstemperatur . . . . .	127
5.4.7	Zustandsdiagramm . . . . .	128
5.5	Einfluss der Fermentation auf die Viabilität . . . . .	130
5.6	Übertragbarkeit ermittelter Prozessgrößen auf die Granulierung von <i>L.paracasei</i>	135
5.7	Variation der Schutzstoffkonzentration . . . . .	138
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>144</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>155</b>
A.1	Stoffwerte . . . . .	155
A.1.1	Stoffwerte der trockenen Luft . . . . .	155
A.1.2	Stoffwerte von Wasser . . . . .	157
A.1.3	Stoffwerte von Wasserdampf . . . . .	157
A.2	Wirbelschichtkenngrößen . . . . .	159
A.3	Stoff- und Wärmeübergang in der Wirbelschicht . . . . .	161
A.3.1	Stoff- und Wärmeübergang zwischen Luft und Partikeln . . . . .	161
A.3.2	Wärmeübergang zwischen Partikeln und Wand . . . . .	162
A.3.3	Wärmeübergang zwischen Wand und Umgebung . . . . .	162
A.3.4	Wärmeübergang zwischen Luft und Wand . . . . .	162
A.4	Ergebnisse und Versuchsdaten . . . . .	163
A.4.1	Zusammenfassung Lagerungsexperimente . . . . .	163
A.4.2	Bestimmung der Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante während der Trocknung . . . . .	164
A.4.3	Vergleich Wirbelschichttrocknung mit den Daten von Lievens . . . . .	166
	<b>Publikationsliste</b>	<b>171</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Viabilitätsbestimmende Einflussgrößen während der Herstellung, Trocknung und Lagerung von Mikroorganismen mit den dazu gehörigen Auswirkungen auf die Zellen . . . . .	7
2.2	Darstellung einer bakteriellen Zellwand (Kayser et al., 2001) . . . . .	10
2.3	REM Aufnahme von <i>L.plantarum</i> mit 4000-facher Vergrößerung . . . . .	11
2.4	Schematische Darstellung einer charakteristischen Wachstumskurve von Bakterien, eingeteilt in unterschiedliche Wachstumsphasen . . . . .	12
2.5	Darstellung einer Trocknungskurve mit $X_{kr}$ und $X_{Gl}$ . . . . .	15
2.6	Schematische Darstellung eines Phasenübergangs vom flüssig-kristallinen Zustand in den Gelzustand. (Santivarangkna et al., 2008a) . . . . .	18
2.7	Grafische Darstellung des stabilisierenden Einflusses von Schutzstoffen auf die Zellmembran von Mikroorganismen . . . . .	21
2.8	Top-Spray und Bottom-Spray Coating (Fries et al., 2012) . . . . .	24
2.9	Sprühcoaten auf Trägermaterial in der Wirbelschicht (Glatt GmbH) . . . . .	25
2.10	Experimentell ermittelte k-Werte unterschiedlicher Kohlenhydrate als Funktion ihrer wasserfreien Glasübergangstemperatur $T_g$ . Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden beträgt 0,959 (Roos, 1993) . . . . .	28
2.11	Einfluss der Wasseraktivität auf das Verderben von Lebensmitteln (Labuza et al., 1971) . . . . .	32
2.12	Schematische Darstellung einer Sorptionsisotherme bestehend aus Adsorptions- und Desorptionsisotherme (Uhlemann et al., 2000) . . . . .	33
2.13	Darstellung der vier am häufigsten vorkommenden Sorptionsisothermen . . . . .	34
2.14	Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur, Wassergehalt und Wasseraktivität. Bei einer kritischen Lagerungstemperatur a ergibt sich die dazugehörige Wasseraktivität b und der Wassergehalt c. (abgeändert von Santivarangkna et al., 2011) . . . . .	36
3.1	Gesamtübersicht der Vorgehensweise zur Herstellung von bioaktiven Granulaten mit zugehöriger Zielstellung und Analyse . . . . .	38
3.2	Darstellung des verwendeten Rührkesselbioreaktors mit zwei Scheibenrührern	42
3.3	Biostat A Plus Rührkesselbioreaktor der Fa. Sartorius (sartorius.com) . . . . .	43
3.4	Schematischer Ablauf zur Herstellung von Verdünnungsreihen aus einer Bakteriensuspension . . . . .	45

3.5	<i>L.plantarum</i> auf einer MRS-Agarplatte nach 72 Stunden Inkubation bei 30°C	46
3.6	Schematische Darstellung der ProCell 5 Wirbelschicht-Laboranlage von der Fa. Glatt	51
3.7	Messprinzip zur Bestimmung der Gasfeuchte mit Hilfe eines Taupunktspiegelhygrometers	52
3.8	Darstellung der ProCell 5 Anlage von der Firma Glatt mit der dazugehörigen Peripherie	53
3.9	Darstellung eines Maltodextrin-Partikels vor und nach der Eindüsung der Bakteriensuspension in die Wirbelschichtanlage	54
4.1	Darstellung des Wirbelschichttrocknungsmodells	64
5.1	Darstellung des Wachstumsverlaufs von <i>L.plantarum</i> kultiviert im Schüttelkolben im 1 l Maßstab in MRS-Bouillon, $T = 30^{\circ}\text{C}$ , Rührerdrehzahl = 150 rpm, ohne Begasung und Neutralisation (n = 3)	73
5.2	Darstellung der Wachstumskurve aus einer 2 l- Bioreaktor Kultivierung von <i>L.plantarum</i> , $T = 30^{\circ}\text{C}$ , Rührerdrehzahl = 200 rpm, ohne Begasung und Neutralisation (n = 3)	74
5.3	Darstellung der Wachstumskurve aus einer 2 l- Bioreaktor Kultivierung von <i>L.plantarum</i> , $T = 30^{\circ}\text{C}$ , Rührerdrehzahl = 200 rpm, ohne Begasung und mit 1 M NaOH- Lösung als Neutralisationsmittel (n = 3)	75
5.4	Darstellung der Verläufe der Gaseintritts-, Schicht- und Gasaustrittstemperatur bei der Granulierung von <i>L.plantarum</i> bei einer Eindüungszeit von 20 Minuten und einer Nachtroknungszeit von zehn Minuten	79
5.5	Darstellung der Gasfeuchte bei der Granulierung von <i>L.plantarum</i> bei einer Eindüungszeit von 20 Minuten und einer Nachtroknungszeit von zehn Minuten	80
5.6	Darstellung des verdunsteten Wassermassenstromes bei der Granulierung von <i>L.plantarum</i> bei einer Eindüungszeit von 20 Minuten und einer Nachtroknungszeit von zehn Minuten	81
5.7	Viabilität von <i>L.plantarum</i> vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin und Zuckerpellets als Trägermaterialien bei einer Eindüungszeit von 180 Minuten, $T_{ein} = 40^{\circ}\text{C}$ , $p_{spr} = 4\text{ bar}$ , $\dot{M}_{spr} = 270\text{ g/h}$ , $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85\text{ kg/h}$ und $\dot{M}_{L,Zuckerpellets} = 100\text{ kg/h}$ . Die Nachtroknungszeit beträgt zehn Minuten	83
5.8	Viabilität von <i>L.plantarum</i> vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets und Laktose sowie des Zellschutzstoffes Trehalose bei einer Eindüungszeit von 60 Minuten, $T_{ein} = 40^{\circ}\text{C}$ , $p_{spr} = 4\text{ bar}$ , $\dot{M}_{spr} = 270\text{ g/h}$ , $\dot{M}_{L,Laktose} = 75\text{ kg/h}$ , $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85\text{ kg/h}$ , $\dot{M}_{L,Zuckerpellets} = 100\text{ kg/h}$ . Die Nachtroknungszeit beträgt zehn Minuten	84

5.9	Viabilität von <i>L.plantarum</i> vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und dem Maltodextrin-Laktose Gemisch bei einer Eindüsungszeit von 40 Minuten, $T_{ein} = 40\text{ °C}$ , $p_{spr} = 4\text{ bar}$ , $\dot{M}_{spr} = 270\text{ g/h}$ , $\dot{M}_{L,Laktose} = 75\text{ kg/h}$ , $\dot{M}_{L,Malto-Lakto} = 80\text{ kg/h}$ und $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85\text{ kg/h}$ . Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten . . . . .	85
5.10	Viabilität von <i>L.plantarum</i> vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial und der Zellschutzstoffe Trehalose sowie Sorbitol bei einer Eindüsungszeit von 30 Minuten, $T_{ein} = 40\text{ °C}$ , $p_{spr} = 4\text{ bar}$ , $\dot{M}_{spr} = 270\text{ g/h}$ , $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85\text{ kg/h}$ . Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten ( $n = 3$ ) . . . . .	86
5.11	Viabilität von <i>L.plantarum</i> vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol sowie Maltodextrin ohne Schutzstoff bei einer Eindüsungszeit von 20 min, $T_{ein} = 40\text{ °C}$ , $p_{spr} = 4\text{ bar}$ , $\dot{M}_{spr} = 270\text{ g/h}$ , $\dot{M}_{Maltodextrin} = 85\text{ kg/h}$ . Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten ( $n = 3$ ) . . . . .	87
5.12	Darstellung der Simulationsergebnisse des Wärmeübergangs am Beispiel der Trocknung von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol	92
5.13	Darstellung der Simulationsergebnisse des Stoffübergangs am Beispiel der Trocknung von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol	92
5.14	Darstellung der Simulationsergebnisse des Stoffübergangs am Beispiel der Trocknung von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol	93
5.15	Bestimmung der Inaktivierungskonstanten $k_X$ aus den Trockenschrankeexperimenten . . . . .	96
5.16	Bestimmung der Inaktivierungskonstanten $k_T$ aus den Trockenschrankeexperimenten . . . . .	97
5.17	Mess- und Simulationsergebnisse zur Inaktivierung von <i>L.plantarum</i> , granuliert unter Zuhilfenahme von Maltodextrin und Sorbitol, während der anschließenden Trocknung . . . . .	98
5.18	Lebendzellzahlen $N_l$ von <i>L.plantarum</i> in KbE/g Granulat bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets bei einer Lagerungstemperatur von $4\text{ °C}$ über sechs Monate . . . . .	99
5.19	Lebendzellzahlen $N_l$ in KbE/g Granulat von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets bei der Lagerung bei Raumtemperatur über sechs Monate . . . . .	100
5.20	Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen $N_l$ von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung, bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets bei einer Temperatur von $4\text{ °C}$ über sechs Monate . . . . .	101
5.21	Logarithmus der Lebendzellzahlen $N_l$ von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung, bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets bei Raumtemperatur über sechs Monate . . . . .	102

5.22	Lebendzellzahl $N_l$ in KbE/g Granulat von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets und Laktose bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C über eine Lagerungszeit von mindestens sechs Monaten . . . . .	103
5.23	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Verlauf der Lebendzellzahlen $N_l$ in KbE/g Granulat von <i>L.plantarum</i> unter Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets und Laktose . . . . .	104
5.24	Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung $N_l$ [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets, Laktose sowie des Schutzstoffes Trehalose . . . . .	105
5.25	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung $N_l$ [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets, Laktose sowie des Schutzstoffes Trehalose . . . . .	106
5.26	Lebendzellzahl $N_l$ in KbE/g Granulat von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und dem Maltodextrin-Laktose Gemisch bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C über eine Lagerungszeit von mindestens sechs Monaten . . . . .	107
5.27	Lebendzellzahl $N_l$ in KbE/g Granulat von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und dem Maltodextrin-Laktose Gemisch bei Raumtemperatur über eine Lagerungszeit von mindestens sechs Monaten . . . . .	108
5.28	Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung $N_l$ [KbE/g] bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ [KbE/g] nach der Trocknung bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und einem Maltodextrin-Laktose Gemisch sowie des Schutzstoffes Trehalose . . . . .	109
5.29	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung $N_l$ [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und einem Maltodextrin-Laktose Gemisch sowie des Schutzstoffes Trehalose . . . . .	110
5.30	Lebendzellzahl $N_l$ in KbE/g Granulat von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung der Zellschutzstoffe Trehalose und Sorbitol sowie des Trägermaterials Maltodextrin bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C über eine Zeit von sechs Monaten . . . . .	111
5.31	Lebendzellzahl $N_l$ in KbE/g Granulat von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung der Zellschutzstoffe Trehalose und Sorbitol sowie des Trägermaterials Maltodextrin bei der Lagerung bei Raumtemperatur über eine Zeit von sechs Monaten . . . . .	112

5.32	Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung $N_l$ [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin sowie der Schutzstoffe Trehalose und Sorbitol . . . . .	113
5.33	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung $N_l$ [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin sowie der Schutzstoffe Trehalose und Sorbitol . . . . .	114
5.34	Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Lebendzellzahl $N_l$ in KbE/g Granulat von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung von Maltodextrin mit und ohne Zugabe des Zellschutzstoffes Sorbitol . . . . .	115
5.35	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Lebendzellzahl $N_l$ in KbE/g Granulat von <i>L.plantarum</i> bei Verwendung von Maltodextrin mit und ohne Zugabe des Zellschutzstoffes Sorbitol . . . . .	116
5.36	Lebendzellzahl von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung $N_l$ [KbE/g] bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ [KbE/g] nach der Trocknung. 20 Minuten Eindüsung und zehn Minuten Nachtrocknung. Die Lagerung erfolgt über sechs Monate bei 4 °C . . . . .	117
5.37	Logarithmus der Lebendzellzahl von <i>L.plantarum</i> während der Lagerung $N_l$ [KbE/g] bezogen auf die Lebendzellzahl $N_t$ [KbE/g] nach der Trocknung, 20 Minuten Eindüsung und zehn Minuten Nachtrocknung. Die Lagerung erfolgt über sechs Monate bei Raumtemperatur . . . . .	118
5.38	Zusammenhang zwischen Wasseraktivität und Inaktivierungskonstante aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C und Raumtemperatur über sechs Monate	119
5.39	Zusammenhang zwischen Wassergehalt und Inaktivierungskonstante aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C und 25 °C über sechs Monate . . . . .	120
5.40	Adsorptionsverhalten wirbelschichtgetrockneter Maltodextrin und <i>L.plantarum</i> Granulate bei 5 °C und Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Wasseraktivität (Symbole stehen für die experimentellen Daten, die Linien für die durch das GAB-Modell angepassten Daten) . . . . .	124
5.41	Sorptionsverhalten wirbelschichtgetrockneter Maltodextrin und <i>L.plantarum</i> Granulate mit dem Schutzstoff Sorbitol bei 5 °C und Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Wasseraktivität (Symbole stehen für die experimentellen Daten, die Linien für die durch das GAB-Modell gefitteten Daten) . . . . .	125
5.42	Sorptionsverhalten verschiedener wirbelschichtgetrockneter Maltodextrin und <i>L.plantarum</i> Granulate bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Wasseraktivität (Symbole stehen für die experimentellen Daten, die Linien für die durch das GAB-Modell gefitteten Daten) . . . . .	126
5.43	Glasübergangstemperatur der bioaktiven Granulate, bestehend aus dem Zweifachgemisch Maltodextrin und <i>L.plantarum</i> sowie dem Dreifachgemisch Maltodextrin, <i>L.plantarum</i> und Sorbitol, in Abhängigkeit von der Wasseraktivität und dem Sorptionsverhalten bei Raumtemperatur . . . . .	128

5.44	Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur, Wasseraktivität und Wassergehalt von dem bioaktiven Granulat, bestehend aus <i>L.plantarum</i> , Sorbitol und Maltodextrin . . . . .	129
5.45	Viabilität pH-Wert geregelter (n = 3) und nicht pH-Wert geregelter (n = 3) <i>L.plantarum</i> Zellen während der Fermentation, vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial und Sorbitol als Schutzstoff bei t = 30 min, $\vartheta_{ein} = 40\text{ °C}$ , $p_{spr} = 4\text{ bar}$ , $\dot{M}_{Spr} = 270\text{ g/h}$ , $\dot{M}_{L,Malto} = 85\text{ kg/h}$ . Die Nachtrochnungszeit beträgt zehn Minuten	131
5.46	Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Lebendzellzahl $N_l$ in KbE/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten <i>L.plantarum</i> Zellen aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen . . . . .	132
5.47	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Lebendzellzahl $N_l$ in KbE/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten <i>L.plantarum</i> Zellen aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen .	133
5.48	Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von wirbelschichtgetrockneten <i>L.plantarum</i> Zellen aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen . . . . .	133
5.49	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von wirbelschichtgetrockneten <i>L.plantarum</i> Zellen aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen	134
5.50	Viabilität von <i>L.paracasei</i> vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial sowie eines firmeninternen Schutzstoffes bei einer Eindüsungzeit von 20 Minuten, $\vartheta_{ein} = 40\text{ °C}$ , $p_{spr} = 4\text{ bar}$ , $\dot{M}_{Spr} = 270\text{ g/h}$ und $\dot{M}_{L,Malto} = 85\text{ kg/h}$ . Die Nachtrochnungszeit beträgt zehn Minuten (n = 3) . . . . .	136
5.51	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur und 4 °C über sechs Monate: Lebendzellzahlen $N_l$ in KbE/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten <i>L.paracasei</i> Zellen . . . . .	137
5.52	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur und 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von wirbelschichtgetrockneten <i>L.paracasei</i> Zellen . . . . .	137
5.53	Viabilität von <i>L.paracasei</i> vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial sowie des firmeninternen Schutzstoffes und der jeweiligen Sorbitolkonzentrationen von 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 mol/l bei t = 20 min, $\vartheta_{ein} = 40\text{ °C}$ , $p_{spr} = 4\text{ bar}$ , $\dot{M}_{Spr} = 270\text{ g/h}$ und $\dot{M}_{L,Malto} = 85\text{ kg/h}$ mit einer Nachtrochnungszeit von zehn Minuten .	139
5.54	Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen: Lebendzellzahlen $N_l$ in KbE/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten <i>L.paracasei</i> Zellen . . . . .	140
5.55	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen: Lebendzellzahlen $N_l$ in KbE/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten <i>L.paracasei</i> Zellen . . . . .	141
5.56	Lagerungsexperiment unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von wirbelschichtgetrockneten <i>L.paracasei</i> Zellen . . . . .	141

5.57	Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen : Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von wirbelschichtgetrockneten <i>L.paracasei</i> Zellen . . . . .	142
A.1	Bestimmung der Inaktivierungskonstante $k_t$ während der Wirbelschicht-trocknung von <i>L.plantarum</i> bei $\vartheta_{ein} = 40$ °C, $\dot{M}_{Spr} = 270$ g/h, $p_{Spr} = 4$ bar, $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85$ kg/h bei einer Eindüsungszeit von 20 Minuten und einer Nachtrocknungszeit von zehn Minuten . . . . .	164
A.2	Bestimmung der Inaktivierungskonstante $k_t$ während der zehnminütigen Trocknung von <i>L.plantarum</i> -Granulaten im Trockenschrank bei 30, 40 und 50 °C . . . . .	166
A.3	Vergleich der Daten für die Wirbelschichttrocknung von <i>L.plantarum</i> bei $\vartheta_{ein} = 40$ °C, $\dot{M}_{Spr} = 270$ g/h, $p_{Spr} = 4$ bar, $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85$ kg/h bei einer Eindüsungszeit von 20 Minuten und einer Nachtrocknungszeit von zehn Minuten mit den Daten von Lievense (1991) $\vartheta_{ein} = 90$ °C, $M_L = 450$ l/min . . . . .	167

# Symbolverzeichnis

## Lateinische Buchstaben

Formelzeichen	Bezeichnung	Einheit
A	Fläche	$m^2$
A	Aktuelle zur ursprünglichen Lebendzellzahl	-
$A_v$	Volumenbezogene Partikeloberfläche	$m^2/m^3$
$a_w$	Wasseraktivität	-
c	Konzentration	g/l
c	Spezifische Wärmekapazität	W/(kg K)
$C_p$	Wärmekapazität bei konstantem Druck	J/K
$c_p$	Spezifische Wärmekapazität bei konstantem Druck	J/(kg K)
C	BET- bzw. Guggenheim-Konstante	-
d	Durchmesser	m
D	Diffusionskoeffizient	$m^2/s$
E	Trocknungseffizienz	[-]
f	Rührerdrehzahl	[rpm]
$\Delta h$	Spezifische Enthalpie	J/kg
H	Enthalpie	J
H	Höhe der Wirbelschicht	m
$\dot{H}$	Enthalpiestrom	W
k	Konstante aus Gordon-Taylor-Gleichung	-
$k_B$	Boltzmann-Konstante	J/K
k	Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante	1/Zeit
K	Kolonien	-
$K_m$	Konstante für Maltodextrin	kg K/kmol
L	GAB-Korrekturfaktor	-
m	Masse	kg
$\dot{m}$	Trocknungsgeschwindigkeit	$kg_{H_2O}/m^2 s$
M	Molmasse	kg/kmol
$M_{max}$	Monolayer Wassergehalt	$kg_{H_2O}/kg_{T_s}$
$\dot{M}$	Massenstrom	kg/s

$n$	Anzahl der Werte	-
$N$	Lebendzellzahl	KbE/ml
$p$	Druck	bar
$p$	Anpassungsparameter für die Trocknungskurve	-
$q$	Diskretisierungsfaktor	-
$\dot{Q}$	Wärmestrom	W
$r$	Hydrodynamischer Radius der diffundierenden Teilchen	m
$\bar{S}_Z$	Empirische Standardabweichung	-
$t$	Zeit	s
$T$	Temperatur	K
$T_g$	Glasübergangstemperatur	°C
$V$	Volumen	l
$x$	Massenanteil	-
$X$	Wassergehalt	$kg_{H_2O}/kg_{T_s}$
$Y$	Gasbeladung	$kg_{H_2O}/kg_{tr,L}$
$z$	Längskoordinate, Höhe über dem Boden	m
$Z$	Unterschiedliche Messgrößen	-
$\bar{Z}$	Arithmetisches Mittel	-

## Griechische Buchstaben

Formelzeichen	Bezeichnung	Einheit
$\alpha$	Wärmeübergangskoeffizient	$[W/m^2 K]$
$\beta$	Stoffübergangskoeffizient	[m/s]
$\delta$	Delta(Differenz)	[-]
$\eta$	Normierte Produktfeuchte	[-]
$\eta$	Dynamische Viskosität des Lösungsmittels	$[Ns/m^2]$
$\vartheta$	Temperatur	[°C]
$\dot{\nu}$	Normierte Trocknungsgeschwindigkeit	[-]
$\rho$	Dichte	$[kg/m^3]$
$\phi$	Relative Feuchte	[-]
$\tau$	Vertrauensbereich	[-]

## Tiefgestellte Indizes

Index	Bezeichnung
I	Erster Trocknungsabschnitt
a	Anfang der Lagerung (nach der Trocknung)
app	apparent
App	Apparat
as	Adiabatische Sättigung
bed	Bett
BTM	Biotrockenmasse
cal	berechnet
D	Dampf
dehydr	Dehydrierung
e	Ende der Lagerung
ein	Eintritt
eind	Eindüsen
evap	Verdunstung
fest	Feststoffgehalt
g	Gas
Ges	Gesamt
Gl	Gleichgewicht
Gnie	nach Gnielinski
Gra	Granulat
Ino	Inokulum
kr	Kritisch
l	Lagerung
L	Luft
m	Membran
max	Maximal
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
P	Partikel
P	Produkt
Pe	Pellet
prot	Schutzstoff
rot	Rotation
Rea	Bioreaktor

Rg	Reagenzglas
S	Sorbitol
Sch	Schüttelkolben
Spr	Sprühlösung
Sus	Suspension
t	Trocknung
therm	thermisch
tot	total
trans	Translation
tr	trocken
T	Temperatur
T	Trehalose
Ts	Trockensubstanz
U	Umgebung
Via	Viabilität
VF	Verdünnungsfaktor
W	Wand
wb	Gutsbeharrungszustand
wl	Wasser
WS	Wirbelschicht
0	vor der Trocknung

## Hochgestellte Indizes

Index	Bezeichnung
n	Anzahl
DGCC	Dupont Global Culture Collection
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

## Abkürzungen

Index	Bezeichnung
KbE	Kolonie bildende Einheiten
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	Rounds per minute

## Dimensionslose Kennzahlen

Index	Bezeichnung
Sh	Sherwood-Zahl
Re	Reynolds-Zahl
Sc	Schmidt-Zahl

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Allgemeines

Starterkulturen spielen seit dem 19. Jahrhundert eine entscheidende Rolle bei der Herstellung von Lebensmitteln. Bezogen auf Deutschland wurden im Jahr 2009 in der Molkereindustrie 20 Milliarden Euro durch die Nutzung von Starterkulturen umgesetzt. Somit ist diese Branche eine der umsatzstärksten in der gesamten deutschen Nahrungsmittelindustrie (Branchenguide, 2011). Dabei stellen die Milchsäurebakterien die größte und wichtigste Gruppe der bakteriellen Starterkulturen dar (Peighambardoust et al., 2011). Ihre Nutzung ist seit 1920 (Santivarangkna et al., 2007) sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch in der Landwirtschaft für die Silageherstellung weit verbreitet.

Milchsäurebakterien werden für diverse Industrieanwendungen eingesetzt. Neben ihrer Funktion als Starterkultur für die Molkereindustrie (Holzapfel and Schillinger, 2001), (Fu and Chen, 2011) werden sie auch als Zusatzstoffe in Lebensmitteln verwendet. Ihre Fähigkeit, Aromen, Geschmack und Konsistenzen in Lebensmitteln zu verbessern, lässt ihr Anwendungsgebiet immer weiter wachsen. Dieses erstreckt sich heute, seit Bekanntgabe der positiven Wirkung auf die Darmflora des Menschen, auch in den medizinischen und pharmazeutischen Bereich. Der gesundheitliche Vorteil, hervorgerufen durch die probiotische Wirkung auf die Darmflora, lässt den Einsatz von Milchsäurebakterien auch hier immer weiter steigen. Gemäß Champagne et al. (2005) und Chávez and Ledebauer (2007) wirken sich Bakterienkonzentrationen von  $10^6$  -  $10^8$  KBE/g Lebensmittel positiv auf die Darmflora aus. Dabei wird durch die Bildung von Milchsäure der pH-Wert im Darm abgesenkt und somit die Fremdbesiedelung von Darmkeimen verhindert. Diese Fähigkeit der Ansäuerung wird obendrein in der Lebensmittelindustrie dazu genutzt, die Haltbarkeit und Lagerfähigkeit von Lebensmitteln zu verbessern.

Daher steigt der Bedarf an Milchsäurebakterien und es besteht das fortwährende Bestreben, immer größere Mengen davon her- und bereitzustellen. Während der Zeit der Bereitstellung ergeben sich jedoch wegen der hohen Viabilitätsverluste große Probleme, denen eine Vielzahl von Forschungsgruppen nachgingen. Dabei wurden unterschiedlichste Verfahren getestet. Ein gängiges und das heute am meisten angewandte Verfahren zur Bereitstellung ist die Herstellung von getrockneten Milchsäurebakterien durch die Gefriertrocknung. Bevor sich diese jedoch in der Lebensmittelindustrie durchsetzte, wurden die gewünschten Bakterien als Flüssigkultur zu den Verbrauchern geliefert. Dies hatte den Nachteil, dass diese Flüssigkulturen zur Bereitstellung des notwendigen Inokulumvolumens

kultiviert werden mussten und dadurch das Risiko einer Kontamination gegeben war. Zugleich mussten je nach Nachfrage große Mengen an Inokulumvolumina hergestellt werden. Dies erforderte zum Einen zusätzliche Kultivierungen im Großmaßstab und zum Anderen war es sehr zeitintensiv. Ein weiterer Nachteil war die stark begrenzte Haltbarkeit von Flüssigkulturen. Damit für den Verbraucher Bakterien mit ausreichender Aktivität und hoher Lebendzellzahl angeboten werden konnten, wurden die Flüssigkulturen durch konservierte Kulturen ersetzt. Bis heute werden Bakterien eingefroren oder lyophilisiert zu den Verbrauchern transportiert. Beim Gefrieren bei -20 bis -40 °C können die Mikroorganismen im gefrorenen Zustand zwei bis drei Monate ohne Viabilitätsverluste gelagert werden (Robinson, 1983). Bei Lagerungszeiträumen darüber hinaus werden die Mikroorganismen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schocktieftiefgefroren und behalten somit ihre volle Aktivität. Bezüglich der hohen Betriebskosten für die Produktion und der benötigten Kühlkette erweist sich diese Methode jedoch als unwirtschaftlich und es wird aufgrund der hohen Transport- und Lagerkosten auf die Gefriertrocknung zurück gegriffen. Die Gefriertrocknung zählt heute zu den am häufigsten angewandten Trocknungsverfahren. Die Flüssigkultur wird geerntet, eingefroren und unter Vakuum getrocknet. Unter Ausschluß von Luftsauerstoff und einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen kann die Aktivität über Monate erhalten bleiben. Dennoch ist ein erheblicher Nachteil dieses Verfahrens der hohe Verlust der Viabilität während der Trocknung durch zellschädigende Eiskristallbildung. Den Ursachen für den hohen Viabilitätsverlust gehen bis heute eine Vielzahl von Forschungsgruppen nach (Carvalho et al., 2004), (Higl et al., 2007), (Kurtmann et al., 2009) und (Passot et al., 2012). Neue Trocknungsverfahren wurden entwickelt und gewinnen immer mehr an Bedeutung. Dabei haben sich vor allem konvektive Trocknungsverfahren, zu denen die Sprüh- und die Wirbelschichttrocknung gehören, etabliert.

Der Vorteil konvektiver Trocknungsverfahren ist die schnelle und kostengünstige Erzeugung von Produkten. In Tabelle 1.1 sind die Herstellungs- und Fixkosten unterschiedlicher Trocknungsverfahren gegenüber gestellt. Bei der Gefriertrocknung handelt es sich zwar um eines der gängigsten Trocknungsverfahren, jedoch rücken angesichts des Zeitaufwands immer häufiger die konvektiven Trocknungsverfahren in den Vordergrund. Neben den hohen Kosten für die Herstellung von gefriergetrockneten Starterkulturen fallen zusätzlich hohe Transport- und Lagerungskosten an. Aus diesem Grund wird die Gefriertrocknung zunehmend unattraktiver für die Hersteller und Lieferanten (Morgan et al., 2006), (Santivarangkna et al., 2007), (Strasser et al., 2009).

**Tabelle 1.1:** Kostenübersicht unterschiedlicher Trocknungsmethoden mit der Gefriertrocknung als Bezugsgröße<sup>a</sup>

Trocknungsart	Fixkosten [%]	Herstellungskosten [%]
Gefriertrocknung	100.0	100.0
Vakuumtrocknung	52.2	51.6
Sprühtrocknung	12.1	20.0
Wirbelschichttrocknung	8.9	17.9
Lufttrocknung	5.4	17.9

<sup>a</sup> (Roser, 1991)

Dadurch gewinnt die Trocknung von Starterkulturen mittels konvektiver Trocknungsverfahren zunehmend an Bedeutung. Die Sprühtrocknung ist eine schnelle und kostengünstige Trocknungsmethode, jedoch ergeben sich bei der Dosierung und in der Abfüllung auf-

grund des staubigen Endproduktes häufig Probleme. Auf Grund hoher Temperaturen treten bei der Trocknung von thermosensitiven Kulturen zudem Viabilitätsverluste auf. Eine schonendere, schnelle und preisgünstige Alternative zur Trocknung von thermosensitiven Produkten stellt dabei die Wirbelschichttrocknung dar (Chua and Chou, 2003), (Bucio et al., 2005). Diese zeichnet sich im Vergleich zu den vorher genannten Gefrier- und Sprühtrocknungsverfahren aus durch:

- Einfaches Feststoffhandling großer Produktmengen
- Homogene Feststoffvermischung
- Mögliche kontinuierliche Betriebsweise
- Optimalen Stoff- und Wärmetransport
- Verbesserte Rieselfähigkeit
- Schnelleres Dispergierverhalten in Flüssigkeiten
- Einstellbares Verpackungsvolumen
- Geringere Investitions- und Betriebskosten.

Ein entscheidender Vorteil dieser Trocknung ist die Gewinnung eines staubfreien Produktes, das sich auf Grund der besseren Dosierbarkeit für spätere Anwendungen in der Lebensmittelindustrie eignet. Der optimale Wärme-, Stofftransport und die gleichmäßige Wärmeverteilung in einer Wirbelschichttrocknungsanlage erlauben schonende und schnelle Trocknungen von hoch sensitiven, biologischen Materialien (Bayrock and Ingledew, 1997b). Gemäß Mille et al. (2004) und Strasser et al. (2009) konnten für den Bakterienstamm *Lactobacillus plantarum* mit der Wirbelschichttrocknung Überlebensraten im Größenbereich von 40 - 100 % erreicht werden. Beiden gelang es, getrocknete Starterkulturen mit einer Anwendungsqualität zu erzeugen, die weitaus besser ist als die für gefriergetrocknete Starterkulturen. Jedoch konnte aus den Arbeiten entnommen werden, dass die Herstellung von getrockneten Starterkulturen ein hohes Maß an Wissen und technischem Know-How erfordert. Sowohl die Produktion als auch die Trocknung beeinflussen die Aktivität intrazellulärer Enzyme, die Stoffwechselaktivität und die Viabilität der Bakterien, die sich schlussendlich auf die Lagerstabilität auswirken (Fonseca et al., 2001).

## 1.2 Stand des Wissens

Wie bereits in dem vorherigen Abschnitt beschrieben, gewinnen die konvektiven Trocknungsverfahren auf Grund der schnellen und kostengünstigen Bereitstellung von lagerfähigen Produkten immer mehr an Bedeutung. Dabei zählt die Wirbelschichttrocknung zu den noch jungen Verfahren, für die bisher nur wenige Arbeiten vorliegen. In diesen Arbeiten wird sich häufig auf die Trocknung von eukaryotischen Mikroorganismen, wie beispielsweise Hefen, beschränkt. Unter anderem trockneten Bayrock and Ingledew (1997a) zwei kommerziell erhältliche, verpresste Hefen in der Wirbelschicht und bestimmten die jeweiligen Wassergehalte, Trocknungskurven und Überlebensraten. Im Rahmen ihrer Arbeit konnten sie feststellen, dass der Verlust der Viabilität während der Trocknung nicht einzig

auf die Höhe der Temperatur zurückzuführen ist. Eine weitere Arbeit zur Wirbelschichttrocknung von Hefen stammt von Akbari et al. (2012), die eine Abhängigkeit zwischen der Sprütrate, der Temperatur und der Viabilität erkannten.

Auf Grund ihrer Größe können Hefen ohne Zugabe von Trägermaterialien in der Wirbelschicht getrocknet werden. Bei der Wirbelschichttrocknung von prokaryotischen Mikroorganismen, zu denen Bakterien gehören, ist dies nicht ohne weiteres möglich. Die Wirbelschichttrocknung muss hier unter Zuhilfenahme von Trägermaterialien erfolgen. Eine der ersten Arbeiten dazu existiert von Zimmermann (1987). Dieser trocknete den Milchsäurebakterienstamm *Lactobacillus paracasei* bei 70 °C unter Zuhilfenahme von Magermilchpulver und ermittelte Viabilitäten kleiner als 1 %. Die hohen Temperaturen hatten einen negativen Einfluss auf die Viabilität der Bakterien. In diesem Zusammenhang soll auf die Arbeit von Linders et al. (1997) verwiesen werden, die durch niedrigere Prozesstemperaturen höhere Überlebensraten von *Lactobacillus plantarum* erzielten. Dabei bettetten sie die Bakterien vor der Trocknung in eine Stärkematrix und erreichten nach der Trocknung Wassergehalte in Höhe von 10 - 13 %. Da sich jedoch derartig hohe Werte nachteilig auf die Lagerstabilität der Bakterien auswirken, wurde im Laufe der Jahre die Wirbelschichttrocknung stets weiter erforscht und die auf die Viabilität einflussnehmenden Größen minimiert. Neben einer hohen Viabilität nach der Trocknung besteht zusätzlich das Bestreben diese auch während der Lagerung zu erreichen. Dadurch wurden Produkte erzeugt, deren Wasseraktivität nach der Trocknung möglichst gering ist und im Größenbereich von 0,2 liegt (Teixeira et al., 1995). Bekanntermaßen ist hierbei die Rede von einem lagerstabilen Produkt.

In Anlehnung daran trockneten Mille et al. (2004) den Bakterienstamm *Lactobacillus plantarum* unter Verwendung des Trägermaterials Casein. Sie erzielten nach der Trocknung Viabilitäten von 80 % und erreichten Wasseraktivitäten in Höhe von 0,2. Trotz dieses Erfolges erforderten die einzelnen Herstellungsschritte bis zur Erzeugung der getrockneten Mikroorganismen einen hohen Arbeitsaufwand. Vor der Trocknung stellten Mille et al. (2004) zunächst eine bestimmte Wasseraktivität im Casein-Pulver ein und vermischten dieses im Anschluss mit den Bakterienpellets unter Zuhilfenahme eines Stößers in einer Keramikschale. Nach der Vermischung wurde die in das Casein-Pulver eingebettete Bakterienmasse der Wirbelschichtanlage hinzugegeben und es erfolgte die Trocknung bei 35 °C Austrittstemperatur. Auf Grund des erhöhten Arbeits- und Zeitaufwandes bei der Vorbereitung der Bakterienmasse erweist sich diese Herangehensweise bei der Trocknung im Großmaßstab als nachteilig. Vielmehr sollten die Vorteile des Wirbelschichttrocknungsverfahrens bezüglich der homogenen Feststoffvermischung ausgenutzt werden und die Vermischung innerhalb der Anlage erfolgen.

Strasser et al. (2009) nutzten diesen Vorteil in ihrer Arbeit und trockneten *Lactobacillus plantarum* mit dem Bottom-Spray-Verfahren unter Zuhilfenahme von Cellulose und unterschiedlichen Schutzstoffen wie Glukose, Saccharose, Trehalose und Maltodextrin bei einer Eintrittstemperatur von 45 °C. Dabei wurden die höchsten Viabilitäten von 40 % bei Verwendung der Schutzstoffe Trehalose und Saccharose erzielt. Somit bekamen auch Schutzstoffe eine neue Bedeutung für die Wirbelschichttrocknung von bioaktiven Materialien. Jedoch stellte sich heraus, dass ohne Zugabe der Schutzstoffe die Überlebensrate der Bakterien  $0,2 \pm 0,2$  % betrug und nach einer Lagerdauer von sechs Monaten sowohl bei 4 °C als auch bei 22 °C die Anzahl der lebenden Zellen null war. Demnach ist Cellulose als Trägermaterial für *Lactobacillus plantarum* ungeeignet. In der Lebensmittelindustrie ist Cellulose zugelassen. Jedoch darf es nur in eingeschränkter Menge den Lebensmitteln

zugesetzt werden. Darüber hinaus ist es nicht wasserlöslich und unverdaulich. Aus diesem Grund ist der Einsatz von Cellulose als Trägermaterial für Milchsäurebakterien fraglich. Die Unverdaulichkeit wirkt sich negativ auf den gesundheitlichen Effekt, der vor allem bei Starterkulturen mit probiotischer Wirkung postuliert wird, aus. Vielmehr besteht das Bestreben der Lebensmittelindustrie darin, sehr gut verdauliche Produkte anzubieten, die sich zudem durch eine hohe Produktqualität auszeichnen. Beispielsweise spielt die Wasserlöslichkeit eine wichtige Rolle, da probiotische Mikroorganismen häufig Getränken und Speisen beziehungsweise Futtermitteln beigemischt werden.

### 1.3 Motivation und Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines für die Lebensmittelindustrie interessanten Kombinationsgranulates bestehend aus Milchsäurebakterien und Trägermaterial, welches sich zum Einen durch eine hohe Keimzahl und zum Anderen durch Eigenschaften wie Wasserlöslichkeit, Verdaulichkeit und Lagerfähigkeit auszeichnet. Die Herstellung soll mit dem kostengünstigen Verfahren der Wirbelschichttrocknung im Top-Spray-Verfahren bei Temperaturen kleiner als 40 °C erfolgen. Zudem soll zur Erzeugung eines lagerstabilen Produktes die Wasseraktivität in dem Größenbereich von 0,2 und der Wassergehalt unterhalb von 6 % liegen. Zur Realisierung dieses Vorhabens sollen zunächst Experimente zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Trägermaterialien auf die Überlebensrate des Milchsäurebakteriums *Lactobacillus plantarum* durchgeführt werden. Dabei wird der Fokus auf die Bestimmung der Lebendzellzahl nach der Trocknung und während der Lagerung gelegt. Des Weiteren soll ermittelt werden, ob pH-Wert-Regelungen während der Fermentation eine Änderung des Zustandes der Bakterien hervorrufen und inwieweit sich diese auf die Viabilität nach der Trocknung auswirken. Zusätzlich sollen unterschiedliche Prozesszeiten der Wirbelschichttrocknung und Schutzstoffe getestet und wiederholt die Viabilität und Lagerstabilität der Bakterien untersucht werden. Aus diesen Erkenntnissen soll ein Zustandsdiagramm erstellt werden, mit dessen Hilfe der Zusammenhang zwischen Viabilität, Wassergehalt, Wasseraktivität sowie der Glasübergangstemperatur gezeigt wird. Daraus sollen die optimalen Bedingungen für ein lagerstabiles Produkt formuliert werden.

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der ermittelten Prozessparameter und -bedingungen für *Lactobacillus plantarum* soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein weiteres Milchsäurebakterium in der Wirbelschicht getrocknet werden. Zur Realisierung dieser Versuche wird das Bakterium *Lactobacillus paracasei*, welches durch eine höhere Sensitivität gekennzeichnet ist, verwendet.

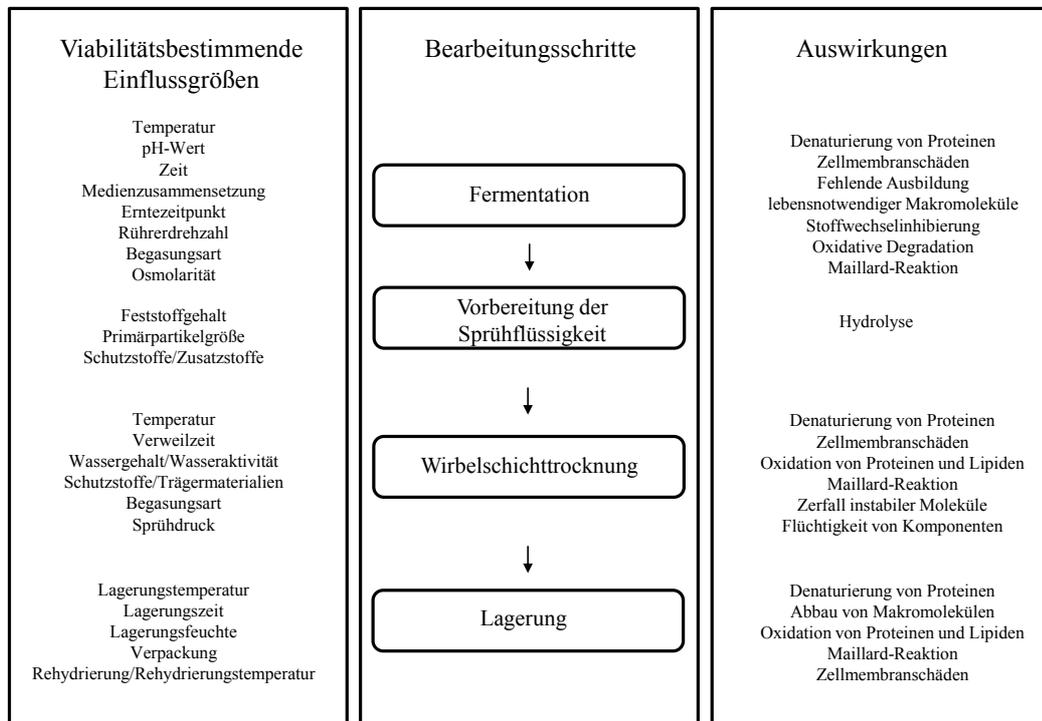
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Modellierung der Inaktivierung von *Lactobacillus plantarum* während der Wirbelschichttrocknung. Dazu soll ein Inaktivierungs- mit einem Wirbelschichttrocknungsmodell gekoppelt werden. Dieses gekoppelte Modell soll ermöglichen, dass sämtliche Stoff- und Wärmeübergänge in der Wirbelschicht erfasst und anschließend in dem Inaktivierungsmodell berücksichtigt werden. Mit Hilfe des Modells soll die zeitliche Viabilitätsabnahme der Bakterien, hervorgerufen durch die Trocknung, berechnet und vorhergesagt werden.

## Kapitel 2

# Theoretische Betrachtung

Die Erzeugung von getrockneten Mikroorganismen stellt hohe Anforderungen an den Herstellungsprozess. Bereits während der Fermentation entstehen durch ungeeignete Kultivierungsbedingungen erste Viabilitäts- und Aktivitätsverluste. Dabei wirken sich viele Faktoren, wie hohe Temperaturen, fehlende Nährstoffe, ungeeignete pH-Werte, hohe Scherkräfte, lange Kultivierungszeiten sowie Kontaminationen schädigend auf den Zustand der Zellen aus. Denaturierungen, Zellmembranschäden, oxidative Degradationen oder Maillard-Reaktionen sind mögliche Antworten der Zelle auf ungeeignete Kultivierungsbedingungen. Die Wahl eines geeigneten Mediums, gegebenenfalls mit zusätzlichen zellschützenden Substanzen, spielt in gleichem Maße eine Rolle für einen stabilen Zustand der Zelle wie der Erntezeitpunkt. Die Ursache dafür liegt darin, dass alle Faktoren für die Ausbildung lebensnotwendiger Makromoleküle maßgebend sind. Auch bei der Trocknung wirken mehrere Faktoren dem Erhalt der Viabilität entgegen. Schon bei der Vorbereitung können Zellschäden entstehen, die den Zustand der Mikroorganismen nach der Trocknung erheblich beeinflussen. Dabei stellt beispielsweise bereits der Feststoffgehalt der Bakterien in der Sprühflüssigkeit einen viabilitätsbestimmenden Faktor dar. Beispielsweise führen hohe Feststoffgehalte in der Sprühflüssigkeit bei Sprühtrocknungen von Mikroorganismen zu größeren Partikeln. Dadurch erhöht sich bis zum Erreichen eines niedrigen Wassergehaltes die Trocknungszeit, welche sich wiederum negativ auf die Viabilität nach der Trocknung auswirkt (Masters, 1979), (Mujumdar, 2007).

Darüber hinaus nehmen während des Trocknungsprozesses weitere viabilitätsbestimmende Faktoren Einfluss auf den Zustand der Zellen. Dazu zählen hohe Temperaturen, lange Prozesszeiten, die Begasungsart und hohe Sprühdreue. Diese Faktoren rufen ähnlich wie bei den ungeeigneten Kultivierungen die zuvor genannten Zellschädigungen hervor. Des Weiteren wird dem Einsatz von Trägermaterialien und Schutzstoffen eine wichtige Rolle für den Schutz der Zellen bei der Trocknung und während der Lagerung zuteil (Linders et al., 1997b), (Bayrock and Ingledew, 1997b), (Conrad et al., 2000), (Bolla et al., 2011). Diese schützen die Zellen während der Trocknung und wirken sich positiv auf deren Zustand aus. Dadurch verringert sich der Einfluss von hohen Temperaturen auf die Zellviabilität. Unerwünschte, bei der Lagerung auftretende Stoffwechselaktivitäten und Zellschäden können unterbunden werden. Eine Gesamtübersicht aller überlebensrelevanter Faktoren während der Herstellung, Trocknung und Lagerung sowie deren Auswirkungen auf den Zellerhalt, ist schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abbildung 2.1:** Viabilitätsbestimmende Einflussgrößen während der Herstellung, Trocknung und Lagerung von Mikroorganismen mit den dazu gehörigen Auswirkungen auf die Zellen

Abbildung 2.1 verdeutlicht, wie hoch die Anzahl der Stressbedingungen für die Mikroorganismen während des gesamten Herstellungsprozesses ist. Diese gilt es weitestgehend zu minimieren. Zur Unterscheidung der verschiedenen Stressfaktoren teilten sie Fu and Chen (2011) in zwei Klassen ein. Zur ersten Klasse zählen die intrinsischen Faktoren, bei denen Stress durch den Fermentationsprozess an sich entsteht. Zur zweiten Klasse gehören die extrinsischen Faktoren, zu denen die zum Herstellungsprozess der getrockneten Mikroorganismen benötigten Träger- und Schutzstoffe, das Trocknungsverfahren und die Lagerungsbedingungen zählen. Je nach Spezies, Stamm und Herstellungsprozess reagieren Mikroorganismen unterschiedlich auf Stress und entwickeln eigene Toleranzen (Morgan et al., 2006), (Meng et al., 2008). Toleranzen können durch pH-Wert-Änderungen oder der Zugabe von Medienzusatzstoffen während der Fermentation induziert werden. Diese wirken sich bei der anschließenden Trocknung positiv auf den Zustand der Zellen aus.

Laut Literatur weisen vor allem grampositive Bakterien eine höhere Stresstoleranz auf und finden dadurch häufig Anwendung bei industriellen Trocknungen. Gramnegativen Bakterien wird hingegen eine geringere Toleranz zugeschrieben (Lieveense and van't Riet, 1994). Der Grund dafür liegt in dem Aufbau der Zellwand. Grampositive Mikroorganismen haben im Vergleich zu gramnegativen eine dickere Zellwand und es wird vermutet, dass sie dadurch robuster auf mechanische Beanspruchungen reagieren (G-Alegria et al., 2004).

Für den in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstamm *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), ein grampositives Bakterium, konnten aus bisherigen Arbeiten hohe Viabilitäten und Ak-

tivitäten sowohl bei der Gefrier- (Carvalho et al., 2003), (G-Alegria et al., 2004), (Strasser et al., 2009) als auch Wirbelschichttrocknung (Linders et al., 1997), (Mille et al., 2004), (Strasser et al., 2009) erzielt werden. Dies deutet auf eine allgemein hohe Stresstoleranz dieser Spezies hin. In Tabelle 2.1 werden die Viabilitäten nach der Gefrier- und Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum* aus mehreren Arbeiten gegenüber gestellt.

**Tabelle 2.1:** Überlebensraten von gefrier- und wirbelschichtgetrockneten *L.plantarum* Zellen im Vergleich <sup>a</sup> (Strasser et al., 2009), <sup>b</sup> (Carvalho et al., 2003), <sup>c</sup> (G-Alegria et al., 2004), <sup>d</sup> (Mille et al., 2004), <sup>e</sup> (Linders et al., 1997)

Trocknungsart	Bakterienstamm	Viabilität nach der Trocknung [%]
Gefriertrocknung		
	<i>L.plantarum</i>	40 <sup>a</sup>
	<i>L.plantarum</i>	91 <sup>b</sup>
	<i>L.plantarum</i>	90 <sup>c</sup>
Wirbelschichttrocknung		
	<i>L.plantarum</i> RD 263	80 <sup>d</sup>
	<i>L.plantarum</i> P743	32 <sup>e</sup>
	<i>L.plantarum</i> IFA No.278	40 <sup>a</sup>

Beim Vergleich der Daten ist zu erkennen, dass mit dem noch jungen Verfahren der Wirbelschichttrocknung vergleichbare Viabilitäten nach der Trocknung wie bei der Gefriertrocknung erreicht werden. Der Vorteil der Gefriertrocknung von prokaryotischen Mikroorganismen ist, dass keine zusätzlichen Trägermaterialien verwendet werden müssen. Nach der Ernte werden die Bakterien gefriergetrocknet und liegen in hohen Konzentrationen vor. Im Falle der Wirbelschichttrocknung reduziert sich die Bakterienkonzentration durch die Zugabe des Trägermaterials und die zu trocknende Bakterienmenge wird somit 'verdünnt'. Aus diesem Grund ist es bei der Herstellung von bioaktiven Granulaten zwingend notwendig ein Trägermaterial zu verwenden, welches sich je nach Anwendungsbereich zusätzlich hervorragend als Zusatzstoff in Lebens- beziehungsweise Futtermitteln eignet. Im Folgenden wird auf die einzelnen viabilitätsbestimmenden Faktoren, die sich bei der Fermentation, Trocknung und Lagerung ergeben, näher eingegangen.

## 2.1 Einfluss der Fermentation auf die Viabilität von Mikroorganismen

In diversen Arbeiten (Palmfeldt and Hahn-Hägerdal, 2000), (Carvalho et al., 2004), (Tsaouisi et al., 2008), (Bauer et al., 2012) wird beschrieben, dass bei der Herstellung von getrockneten Mikroorganismen bereits beim ersten Herstellungsschritt, der Fermentation, die Grundlage für einen stabilen Zustand der Zellen gelegt wird. Dieser wirkt sich nach bisherigen Erkenntnissen positiv auf die Lebensfähigkeit der Zellen nach der Trocknung und Lagerung aus.

Die Fermentation ist dabei allen anderen Schritten vorangestellt. Das Hauptziel liegt in der Erzeugung von hohen Ausbeuten und Zellaktivitäten innerhalb kürzester Zeit. Fermentationen werden bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Abhängig von der Intensität des Stresses, dem die Zellen während der Kultivierung und Aufarbeitung ausgesetzt sind, kann sich dieser, in Abhängigkeit vom verwendeten Bakteri-

enstamm, entweder positiv oder negativ auf die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen auswirken. Stress kann die Bildung von sogenannten „Stressproteinen“ fördern, die Toleranzen gegenüber späteren Trocknungs- und Lagerungsvorgängen mit sich bringen. Die Bildung dieser Proteine kann durch geänderte Kultivierungsbedingungen wie Temperaturverschiebungen, pH-Wert-Änderungen, erhöhte Osmolaritäten und geeignete Bestandteile im Medium gefördert werden. Beispielsweise kommt es zur verstärkten Akkumulation von gelösten Substanzen durch das Vorhandensein von Peptonen, Tryptonen oder Fleisch- und Hefeextrakten (Carvalho et al., 2004). Diese Substanzen dienen als Schutz vor osmotischem Stress und schützen die Zellen somit bei der Trocknung und während der Lagerung.

In gleicher Weise spielt der pH-Wert während der Fermentation eine wichtige Rolle. Er kann molekulare Schutzmechanismen aktivieren und somit die Stresstoleranz erhöhen. Palmfeldt and Hahn-Hägerdal (2000) zeigten, dass sich eine Senkung des pH-Wertes von pH = 6.0 auf pH = 5.0 während der Fermentation von *L.reuteri* positiv auf die Viabilität nach der Gefriertrocknung auswirkte. Die Überlebensrate betrug für Fermentationen, bei denen der pH-Wert nicht durch Zugabe einer Säure oder Base geregelt wurde, 90 %. Die pH-Wert-geregelten Fermentationen wiesen hingegen eine Überlebensrate von 65 % nach der Trocknung auf. Die Arbeitsgruppen um Lorca and de Valdez (2001) und Silva et al. (2005) machten ähnliche Beobachtungen bei der Gefriertrocknung von *L.acidophilus* und der Sprühtrocknung von *L.delbrueckii ssp. bulgaricus*. Eine Änderung des pH-Wertes geht mit einer sichtbaren morphologischen Veränderung der Zellen einher und es wird geschlussfolgert, dass die Zellen durch die induzierte Stressantwort toleranter auf von außen zugeführten Stress reagieren. Jedoch kann gemäß Bauer et al. (2012) diese Stressresistenz nicht ohne weiteres auf alle Bakterienstämme übertragen werden, sondern tritt stammspezifisch auf.

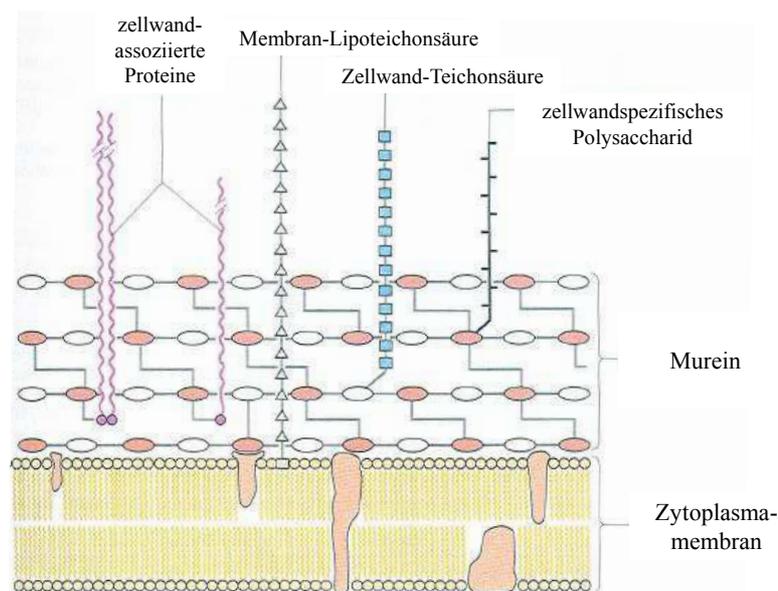
Aber auch veränderte Osmolaritäten und Temperaturen während der Fermentation können die Stresstoleranz von Mikroorganismen verstärken (Giraud et al., 1991). Aus der Arbeit von Desmond et al. (2001) geht hervor, dass die Überlebensrate von *L.paracasei* nach der Sprühtrocknung durch Vorbehandlungen mit Salz und Wärme höher war als bei unbehandelten Zellen. Auch Corcoran et al. (2004) zeigten, dass Bakterienstämme mit größeren Wärme- und osmotischen Resistenzen eine ein- bis zweifach verbesserte Überlebensrate nach der Trocknung aufwiesen. Demnach haben sich die Zellen durch die erhöhten Osmolaritäten und Temperaturen an den Stress adaptiert.

Ein weiterer viabilitätsbestimmender Faktor ist der Erntezeitpunkt. Corcoran et al. (2004) zeigten, dass Zellen, die in der stationären Wachstumsphase geerntet werden, wesentlich stresstoleranter bei anschließenden Trocknungen waren, als Zellen, die aus der Adaptions- oder exponentiellen Phase stammen. Corcoran et al. (2004) konnten für den Bakterienstamm *L.rhamnosus* bei stationären Zellen nach der Trocknung Überlebensraten von 31 - 50 %, 14 % bei exponentiellen Zellen und 2 % bei Zellen aus der Adaptionsphase ermitteln. Es wird geschlussfolgert, dass in der stationären Phase alle Proteine vollständig exprimiert werden, hingegen sich die Proteine in der Adaptions- und exponentiellen Phase noch im Aufbauprozess befinden. In diesem Fall sei darauf hingewiesen, dass eine optimale Erntephase stammspezifisch ist und für jeden Stamm variiert.

### 2.1.1 Morphologie und Aufbau

Mikroorganismen lassen sich in Pro- und Eukaryonten einteilen. Dabei unterscheiden sich die Prokaryonten von den Eukaryonten dahingehend, dass die Zellorganellen und das Cy-

toskelett nicht von einer zusätzlichen Membran umhüllt sind. Zu den Prokaryonten zählen Bakterien, die sich wiederum in Grampositive und Gramnegative gruppieren lassen. Grampositive Bakterien besitzen im Vergleich zu Gramnegativen eine dickere Zellwand, die einen höheren Mureinanteil enthält. Murein stellt den Hauptbestandteil von bakteriellen Zellwänden dar. Es besteht aus vielen verzweigten Polysacchariden, verleiht der Zelle Struktur und bietet Schutz. Die Zellwand fungiert auch als äußeres Gerüst und gleicht Druckunterschiede zwischen dem intra- und extrazellulären Raum aus. Unterhalb der Zellwand befindet sich die Zellmembran, die aus einer Phospholipiddoppelschicht besteht. Der Phosphatteil der Doppelschicht reagiert hydrophil auf Wasser, wohingegen der Lipidteil hydrophob reagiert. Der hydrophobe Lipidteil der Membran zeigt nach außen, wodurch wasserlösliche Moleküle nicht ohne weiteres die Zellmembran passieren können. Somit stellt die Zellmembran die Barriere zwischen dem Zellinneren und dem Zelläußeren dar. In ihr sind zahlreiche Peptidmoleküle eingebunden, die einen kontrollierten Stoffwechsel zwischen dem intra- und extrazellulären Raum erlauben. Dadurch können Stoffe unter Energieverbrauch aktiv in die Zelle transportiert beziehungsweise wieder ausgeschleust werden. Der allgemeine Aufbau einer bakteriellen Zellwand ist in Abbildung 2.2 dargestellt.



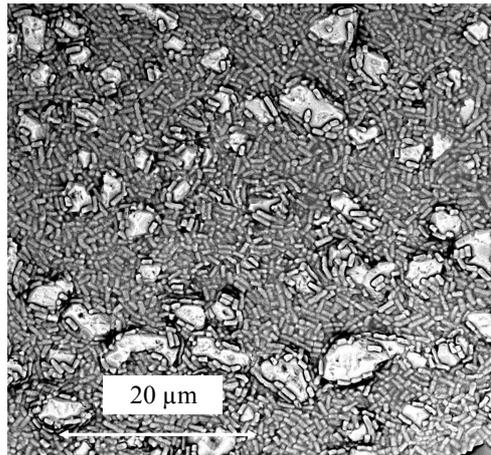
**Abbildung 2.2:** Darstellung einer bakteriellen Zellwand (Kayser et al., 2001)

Da vor allem Schädigungen an der Zellmembran und den Proteinen verantwortlich für den Viabilitätsverlust nach der Trocknung und Lagerung sind, wird in den folgenden Abschnitten näher darauf eingegangen.

### 2.1.2 *Lactobacillus plantarum*

Der Bakterienstamm *L. plantarum* zählt zu den Milchsäurebakterien. Generell haben Milchsäurebakterien sehr komplexe Nährstoffanforderungen. Neben Kohlenhydraten benötigen

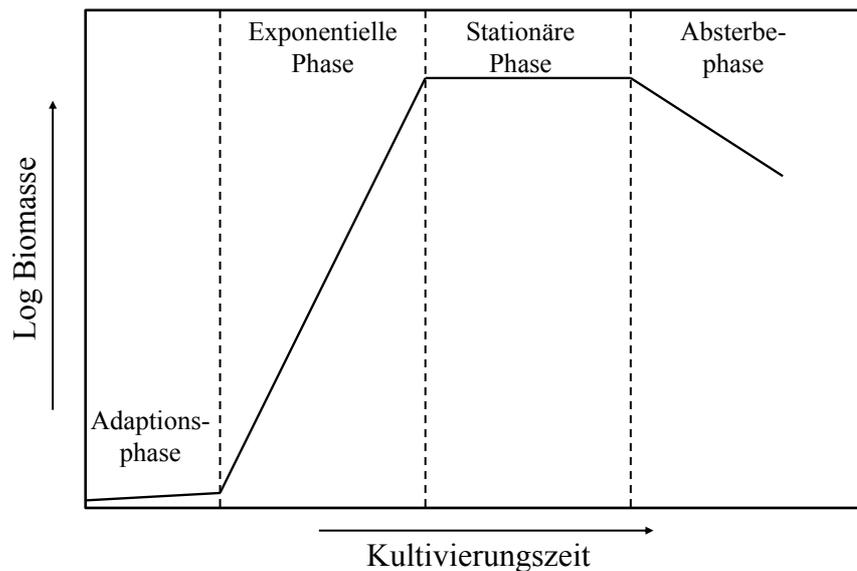
sie zum Wachsen Fette, Fettsäureester, Vitamine, Spurenelemente und Nukleinsäuren. Je nach Bakterienart kann durch die gebildete Milchsäure der pH-Wert bis auf ein Minimum von 3,5 reduziert werden. Im Fall von *L.plantarum* liegt das pH-Minimum bei 4,0 (Giraud et al., 1991). *L.plantarum* ist ein stäbchenförmiges, nicht sporenbildendes, unbewegliches, fakultativ heterofermentatives, aerotolerantes Bakterium, das in Milch, im Darm und in Pflanzen vorkommt (Axelsson, 1993).



**Abbildung 2.3:** REM Aufnahme von *L.plantarum* mit 4000-facher Vergrößerung

Eingesetzt wird *L.plantarum* bei der Reifung von Käse und der Herstellung von Sauerkraut, Sauerteig und Silage (Mozzi et al., 2010). Hierbei dient das gebildete Laktat der Ansäuerung und somit der Haltbarmachung von Lebens- und Futtermitteln. Fakultativ heterofermentative Bakterien vergären hauptsächlich Hexosen zu Laktat. Bei Glukosemangel kann es jedoch im Falle von heterofermentativen Bakterien neben der Bildung von Laktat zur Bildung von Ethanol-, Essigsäure- und  $CO_2$  kommen. *L.plantarum* bildet sowohl D- als auch L-Laktat, wobei sich beide Laktatformen in der Anordnung der Hydroxylgruppen unterscheiden. Des Weiteren ist *L.plantarum* grampositiv und bevorzugt zum Wachsen den mesophilen Temperaturbereich. Die Wachstumsgrenzen liegen zwischen 10 - 45 °C, wobei die optimale Wachstumstemperatur nach Holzappel and Schillinger (2001) 30 °C beträgt. *L.plantarum* wächst anaerob, kann jedoch Sauerstoff durch die Bildung von Wasserstoffperoxid aufnehmen und wird daher als aerotolerant klassifiziert (DeAngelis and Gobbetti, 2004). Laut Lindgren and Dobrogosz (1990) verwenden die Bakterien das gebildete Wasserstoffperoxid und Antibiotikum, Bacteriocin, zur Abwehr gegen natürliche Feinde. Kleerebezem et al. (2003) stellten bei der Genomanalyse fest, dass *L.plantarum* eines der größten Genome aller Milchsäurebakterien besitzt und zusätzlich eine hohe Anzahl regulatorisch agierender Gene aufweist. Diese Erkenntnisse können Indizien für die hohe Stresstoleranz der Bakterien sein und darüber hinaus aufzeigen, dass sich insbesondere *L.plantarum* auf Grund der Flexibilität und Anpassungsfähigkeit gut für Trocknungen eignet. Bevor die Bakterien jedoch getrocknet werden können, müssen sie zunächst durch Kultivierungen hergestellt werden.

Zunächst soll auf den charakteristische Wachstumsverlauf von Bakterien während einer Kultivierung näher eingegangen werden. Dieser lässt sich in vier Phasen einteilen, wobei mit der Adaptionphase begonnen wird, sich die exponentielle und die stationäre Phase anschließen und letztlich der Verlauf mit der Absterbephase endet. In Abbildung 2.4 ist der charakteristische Wachstumsverlauf von Bakterien mit den dazugehörigen Wachstumsphasen schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung einer charakteristischen Wachstumskurve von Bakterien, eingeteilt in unterschiedliche Wachstumsphasen

In der Adaptionphase passen sich die Zellen an die vorherrschenden Bedingungen der Umgebung an. Die Bakterien bilden Enzyme zur Aufspaltung der Nährstoffe und die Biomasse steigt langsam an. Je nach Kultivierungsbedingungen kann die Adaptionphase von unterschiedlicher Dauer sein. Der Zustand der Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Länge der Adaptionphase. Geschädigte Zellen, die aus der stationären oder Absterbephase kommen, adaptieren langsamer als jene aus der exponentiellen Phase. In dieser Phase findet ein exponentielles Wachstum der Zellen verbunden mit einer schnellen Substrataufnahme statt. Parallel kommt es durch den Stoffwechsel der Bakterien zur Bildung von Produkten, die im Fall von *L.plantarum* zur Bildung von Milchsäure führen. Die Milchsäure senkt den pH-Wert im Medium ab. Das Ende der exponentiellen Phase wird durch Substratverarmung und Anreicherung von Stoffwechselnebenprodukten hervorgerufen. Die Bakterien gehen in die stationäre Phase über. In dieser Phase sind alle vorhandenen Nährstoffe im Medium verbraucht und die Zellen können nicht weiter wachsen. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist null und die Anzahl der neu gebildeten Bakterien ist dabei gleich der Anzahl der sterbenden Bakterien. In dieser Phase wird jedoch durch die Nutzung von Speicherstoffen weiterhin Stoffwechsel betrieben. Durch die angereicherten Stoffwechselnebenprodukte und die fehlenden Nährstoffe gehen die Bakterien in die Absterbephase über. In dieser Phase

kommt es zur Lyse, dem Zerfall der Zellen, und die Biomasse sinkt ab.

### 2.1.3 *Lactobacillus paracasei*

Der Bakterienstamm *L.paracasei* zählt wie *L.plantarum* zu den Lactobacillen und gleicht diesem in Aufbau und Stoffwechsel. Seit vielen Jahren wird *L.paracasei* in großen Mengen mit Lebensmitteln aufgenommen und ist daher von großer Relevanz für die Lebensmittelindustrie (Bischoff, 2009). Im Vergleich zu *L.plantarum* handelt es sich hierbei um einen sensitiveren Stamm, der eine weniger hohe Stresstoleranz aufweist (Morelli, 2000). *L.paracasei* wird in der Reifung als Zusatzkultur bei der Käseherstellung und als Probiotikum in Sauer Milchprodukten eingesetzt (Collins et al., 1989). Alle Stämme bilden als Stoffwechselprodukt L-Laktat, wobei einige auch D-Laktat erzeugen. *L.paracasei* wächst in einem Temperaturbereich zwischen 10 - 40 °C. In der Medizin wird es unter anderem als Mittel gegen Diarrhö eingesetzt. Dessen inhibierende Wirkung auf die Aktivität von *Escherichia coli* wird dabei gewinnbringend genutzt. Eine weitere Fähigkeit ist das Erkennen des Karieserregers *Streptococcus mutans*. *L.paracasei* bindet es und verhindert durch die Bindung die Anlagerung von Bakterien an den Zähnen. Daher wird *L.paracasei* auch oft als Zusatzstoff in Zahnpasten verwendet (Tanzer et al., 2010).

## 2.2 Einfluss der Trocknung auf die Viabilität

Getrocknete Mikroorganismen können durch unterschiedlichste Trocknungsverfahren hergestellt werden. In diesem Zusammenhang wird in dieser Arbeit auf das angewandte Verfahren der Wirbelschichttrocknung näher eingegangen. Die wichtigsten Qualitätsanforderungen an den Trocknungsprozess betreffen dabei das Erreichen hoher Viabilitäten und Aktivitäten der Mikroorganismen. Durch den Trocknungsprozess wird den Zellen freies und gebundenes Wasser entzogen. Somit werden Stoffwechselfvorgänge unterbrochen und das Wachstum sowie chemische Reaktionen verlangsamt oder gestoppt (Santivarangkna et al., 2007), (Fu and Chen, 2011). Die Mikroorganismen gehen in einen Ruhezustand über, der im Idealfall durch die Zugabe von Wasser oder gegebenenfalls einer Nährlösung wieder aufgehoben wird. Dies ist jedoch nicht immer der Fall. Ursachen dafür sind unterschiedliche Stressbedingungen, denen die Zellen während der Trocknung ausgesetzt sind. Stressbedingungen sind thermische, osmotische, oxidative und mechanische Belastungen, die die Zellmembran und Proteine der Mikroorganismen zerstören und zu Beeinträchtigungen in der Viabilität sowie in der Aktivität führen.

Weitere Viabilitäts- und Aktivitätsverluste werden während der Trocknung durch den Entzug der Hydrathülle von Proteinen und anderen Makromolekülen hervorgerufen. Dadurch ändert sich die Konformation der Moleküle und somit auch die Funktionalität. Laut Lievense and van't Riet (1994) kommt es innerhalb der Zelle durch den Wasserentzug zu Konzentrationsänderungen von Salzen, Säuren und Basen, welche zusätzlich Schäden bei den Makromolekülen hervorrufen.

In dem nachfolgenden Abschnitt wird zunächst die Trocknung allgemein erläutert. Im Anschluss wird auf die Funktionsprinzipien der Niedertemperaturgranulierung eingegangen. Zudem werden die Inaktivierungsmechanismen während der Trocknung und die Mechanismen, mit denen Mikroorganismen auf Änderungen der Umwelt reagieren, erklärt. Weiterhin wird der Einfluss von Schutzstoffen dargelegt und die Faktoren genannt, die für den

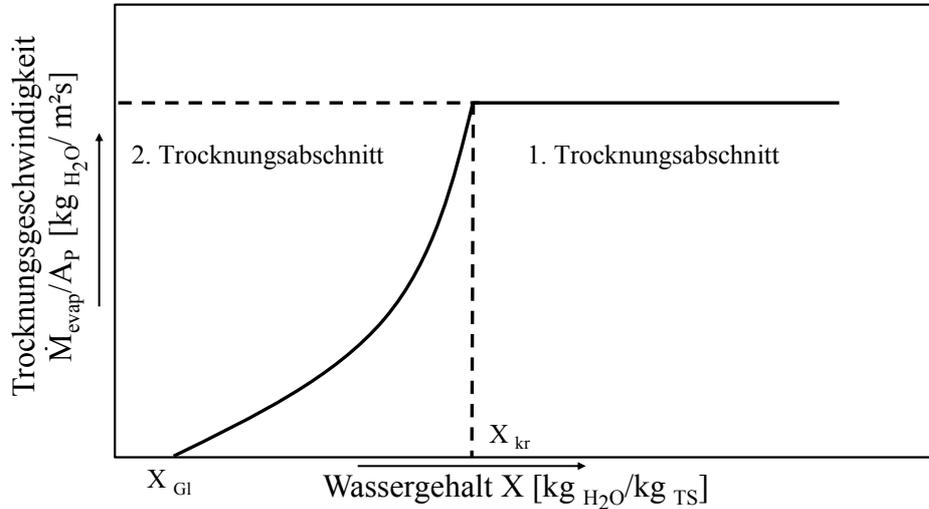
Viabilitätsverlust verantwortlich sind.

### 2.2.1 Trocknung allgemein

Im Allgemeinen ist die Trocknung ein Wärme- und Stoffübergangsprozess, bei dem es zu einer Phasenumwandlung von flüssig zu gasförmig kommt. Dabei kann die Trocknung zum Einen durch Verdampfung und zum Anderen durch Verdunstung erfolgen. Für die Phasenumwandlung wird Energie benötigt, die je nach Trocknungsart auf unterschiedlicher Weise dem System zugeführt wird. Bei dem in dieser Arbeit angewandten konvektiven Trocknungsverfahren, der Wirbelschichttrocknung, wird die Energie mit Hilfe von erhitztem Gas übertragen und der entstehende Dampf durch das in der Wirbelschichtanlage strömende Gas wieder abgeführt.

Im Falle der Trocknung von Mikroorganismen wird demnach den Zellen durch Energieverbrauch freies und gebundenes Wasser entzogen. Ausgehend von bisherigen Arbeiten zur Trocknung von thermosensitiven Materialien wird zunehmend darauf geachtet, hohe Prozesstemperaturen und die daraus resultierenden Viabilitätsverluste während der Trocknung zu vermeiden. Jedoch geht aus der Arbeit von Mille et al. (2005) hervor, dass einzig durch die Herabsetzung der Trocknungstemperatur die Viabilitätsverluste von Mikroorganismen zwar verringert, jedoch nicht beseitigt werden können. Mille et al. (2005) konnten trotz niedriger Prozesstemperaturen und osmotischer Drücke (220 MPa) während der Wirbelschichttrocknung von *Saccharomyces cerevisiae* höhere Viabilitätsverluste im Temperaturbereich zwischen 8 °C und 25 °C als bei Temperaturen ober- beziehungsweise unterhalb dieser beobachten. Dies zeigt, dass einzig durch die Herabsetzung der Temperatur die Erhaltung der Viabilität nicht gewährleistet ist. Vielmehr haben mehrere Faktoren, thermischer, osmotischer, oxidativer und mechanischer Natur, großen Einfluss auf die Viabilität während der Trocknung. Dabei entscheidet vor allem das Zusammenspiel dieser Faktoren und die Dauer, in der die Mikroorganismen diesen Faktoren ausgesetzt sind, über das Überleben. Für das Erreichen von maximalen Überlebensraten ist es daher zwingend notwendig, das Trocknungsverhalten von den eingesetzten Materialien zu bestimmen, die viabilitätsbestimmenden Einflussfaktoren zu kennen und diese bei der Trocknung zu berücksichtigen.

Die Kenntnis über das Trocknungsverhalten der Materialien wird durch das Erstellen von Trocknungskurven der Einzelpartikel gewonnen und variiert je nach Material. Mit Hilfe der ermittelten Trocknungskurven kann abgelesen werden, nach welcher Zeit die gewünschte Endfeuchte im Material erreicht wird. Trocknungskurven lassen sich in den ersten und zweiten Trocknungsabschnitt einteilen. Diese Einteilung ist in der Abbildung 2.5 dargestellt.



**Abbildung 2.5:** Darstellung einer Trocknungskurve mit  $X_{kr}$  und  $X_{Gl}$

Im ersten Trocknungsabschnitt bewegt sich die Flüssigkeit aus dem Inneren des Materials an die Materialoberfläche, so dass die gesamte Oberfläche gleichmäßig befeuchtet ist. Die an der Oberfläche befindliche Flüssigkeit verdunstet mit konstanter Trocknungsgeschwindigkeit in das sie umgebende Medium, in diesem Fall Luft. In diesem Abschnitt hängt die Trocknungsgeschwindigkeit einzig von den äußeren Wärme- und Stoffübergängen ab. Weder die Schichtdicke des Materials noch der Eingangsfeuchtegehalt spielen dabei eine Rolle. Ausschließlich die Trocknungstemperatur und die Feuchte der Luft haben hier einen Einfluss.

Bei der Verdunstung im ersten Trocknungsabschnitt besteht ein Unterschied zwischen der Einzelpartikel- und Wirbelschichttrocknung. Wird eine konstante Trocknungsgeschwindigkeit erreicht, ist bei der Einzelpartikel-trocknung die Rede von einem Gutsbeharrungszustand. In diesem Zustand weist das Einzelpartikel die Gutsbeharrungstemperatur  $\vartheta_{wb}$  und den sich daraus resultierenden Gleichgewichtsdampfdruck an der Oberfläche auf. Die Trocknungsgeschwindigkeit für ein Einzelpartikel im ersten Trocknungsabschnitt wird mit

$$\dot{m}_{\text{evap},I} = \frac{\dot{M}_{\text{evap},I}}{A_p} = \int \rho_{tr,L} \beta_{L,P} (Y_{wb} - Y) \quad (2.1)$$

berechnet. Der in der Abbildung 2.5 dargestellte konstante Verlauf der Trocknungsgeschwindigkeit im ersten Trocknungsabschnitt deutet darauf hin, dass aus dem Inneren des Materials genauso viel Wasser an die Materialoberfläche transportiert wird wie verdunstet. Wird als weiterer Effekt die Hygroskopizität eines Materials betrachtet, vermindert sich

die Trocknungsgeschwindigkeit durch die Dampfdruckerniedrigung. Die Triebkraft wird geringer und aus  $Y_{wb}$  wird  $Y_{Gl}(\vartheta_P, X)$ . Die Trocknungsgeschwindigkeit im ersten Trocknungsabschnitt unter Berücksichtigung eines hygroskopischen Materials verändert sich und wird gemäß

$$\dot{m}_{evap,I} = \frac{\dot{M}_{evap,I}}{A_P} = \int \rho_{tr,L} \beta_{L,P} (Y_{Gl}(\vartheta_P, X) - Y) \quad (2.2)$$

ausgedrückt. Die Bestimmung der hygroskopischen Gleichgewichtsfeuchte  $Y_{Gl}$  erfordert die Kenntnis der Partikeltemperatur  $\vartheta_P$ . Diese lässt sich schwierig messen und muss daher mit Hilfe eines Trocknungsmodells, welches sowohl die Stoff- als auch die Wärmeübergänge während einer Trocknung erfasst, ermittelt werden.

Im Gegensatz zur Einzelpartikel-trocknung wird bei der Wirbelschicht-trocknung von einer Vielzahl von Partikeln ausgegangen. Dadurch wird die Luft beim Passieren der Anlage immer weiter mit Feuchte angereichert und die Partikel kommen mit unterschiedlich feuchter Luft in Kontakt. Dabei wird die Anreicherung zum Einen durch die Fluid-dynamik und zum Anderen durch die Einzelpartikel-kinetik beeinflusst.

Prinzipiell ähneln sich die Verläufe der Trocknungskurven aus einer Einzelpartikel- und Wirbelschicht-trocknung. Diese sind wiederholt gekennzeichnet durch einen Abschnitt mit konstanter Trocknungsgeschwindigkeit. Jedoch stellt sich bei einem unendlich hohen Bett in der Wirbelschicht anstelle des zuvor beschriebenen Gutsbeharrungszustandes ein adiabatischer Sättigungszustand ein. Dieser wird durch die Sättigung der Luft und einer sich aus der Energiebilanz ergebenden Temperatur beschrieben. Trotz der physikalischen Unterschiede bis zum Erreichen des adiabatischen Sättigungs- beziehungsweise des Gutsbeharrungszustandes ergeben sich bei gleicher Trocknungsluft ähnliche Temperaturen im Wirbelbett beziehungsweise im Einzelpartikel.

Bei einem Bett mit begrenzter Höhe wird ein Zustand erreicht, der zwischen Sättigung und Gutsbeharrung liegt. Jedoch wird auf Grund der Vielzahl der Partikel von einem Sättigungszustand ausgegangen. Mit der folgenden Gleichung kann die Trocknungsgeschwindigkeit im ersten Trocknungsabschnitt für ein schwach hygroskopisches Produkt für die Wirbelschicht

$$\dot{m}_{evap,I} = \frac{\dot{M}_{evap,I}}{A_P} = \int \rho_L \beta_{L,P} (Y_{as} - Y) \quad (2.3)$$

berechnet werden. Im Falle eines hygroskopischen Produktes wird die vorher genannte Gleichung 2.2 zur Berechnung der Trocknungsgeschwindigkeit im ersten Trocknungsabschnitt verwendet.

Der Beginn des zweiten Trocknungsabschnittes, dargestellt in der Abbildung 2.5, wird mit der kritischen Feuchte  $X_{kr}$  eingeleitet. An dieser Stelle nehmen die partikelinneren Widerstände zu und es wird weniger Feuchte nach Außen transportiert. Die Trocknungsgeschwindigkeit in diesem Abschnitt nimmt fortlaufend ab. Im Vergleich zum ersten

Trocknungsabschnitt sinkt die Trocknungsgeschwindigkeit bei niedrigerer Feuchte als  $X_{kr}$ . Zusätzlich ergibt sich für die Trocknung im zweiten Abschnitt ein anderer Verlauf.

Auf Grund der Schwierigkeit die Trocknungsgeschwindigkeit in diesem Abschnitt angesichts der Stoff- und Wärmeübergangslimitierungen innerhalb des Produktes vorauszuberechnen, wurde versucht, aus experimentell ermittelten Trocknungskurven Gesetzmäßigkeiten zu finden, mit denen die Trocknungsgeschwindigkeit im zweiten Abschnitt berechnet werden kann. Dies führte zu dem Normierungsansatz von Van Meel (1958). In diesem wird die Trocknungsgeschwindigkeit aus dem ersten Trocknungsabschnitt als Bezugsgröße verwendet und jene aus dem zweiten Trocknungsabschnitt darauf bezogen. Die entstehende dimensionslose Trocknungsgeschwindigkeit wird wie folgt ausgedrückt:

$$\dot{\nu}(\eta) = \frac{\dot{m}_{evap}}{\dot{m}_{evap,I}}. \quad (2.4)$$

- $\dot{m}_{evap,I}$  [ $kg_{H_2O}/m^2s$ ]: Trocknungsgeschwindigkeit im ersten Trocknungsabschnitt
- $\dot{m}_{evap}$  [ $kg_{H_2O}/m^2s$ ]: Trocknungsgeschwindigkeit im zweiten Trocknungsabschnitt
- $\dot{\nu}$  [-]: Normierte Trocknungsgeschwindigkeit
- $\eta$  [-]: Dimensionslose Produktfeuchte

Mit Hilfe der normierten Trocknungskurve wird die Gesamtheit aller limitierenden Widerstände im Produktinneren berücksichtigt. Gemäß Burgschweiger (2000) existieren für die Erstellung von normierten Trocknungskurven zwei Alternativen. Einerseits besteht die Möglichkeit für jedes Material die jeweilige Trocknungskurve von den Einzelpartikeln aufzunehmen. Andererseits können die ermittelten Trocknungsverläufe aus den Wirbelschichttrocknungsexperimenten auf die normierte Trocknungskurve des Einzelpartikels zurückgerechnet werden. Die dimensionslose Produktfeuchte ist wie folgt definiert:

$$\eta = \frac{X - X_{Gl}}{X_{kr} - X_{Gl}}. \quad (2.5)$$

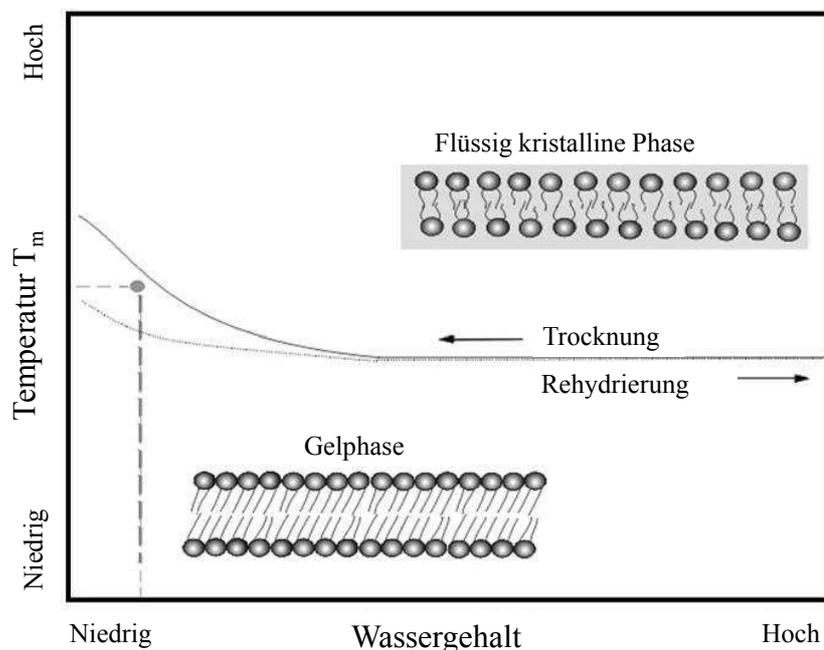
- $X$  [ $kg_{H_2O}/kg_{T_s}$ ]: Wassergehalt
- $X_{Gl}$  [ $kg_{H_2O}/kg_{T_s}$ ]: Gleichgewichtsfeuchte
- $X_{kr}$  [ $kg_{H_2O}/kg_{T_s}$ ]: Kritische Feuchte

Die kritische Feuchte  $X_{kr}$  ist am Ende des ersten Trocknungsabschnittes erreicht und kann aus der Trocknungskurve des Einzelpartikels, dargestellt in der Abbildung 2.5, abgelesen werden. Die Gleichgewichtsfeuchte  $X_{Gl}$  des Einzelpartikels hingegen wird entweder aus einer Sorptionsisotherme oder aus einer experimentell erstellten Trocknungskurve für

Einzelpartikel ermittelt. Bei der Betrachtung von monodispersen Schüttungen wird zur Ermittlung der normierten Trocknungskurve das von Tsotsas (1994) und Groenewold (2004) beschriebene Modell herangezogen. In diesem Modell wird unter anderem auf Grundlage von experimentell ermittelten Trocknungskurven aus Wirbelschichtversuchen auf die normierte Trocknungskurve eines Einzelpartikels geschlossen. Dabei bezog sich die Betrachtung auf diskontinuierliche Prozesse.

### 2.2.2 Phasenübergang der Membran

In diesem Abschnitt soll der Phasenübergang von Zellmembranen erklärt werden. Vor allem Schäden an der Zellmembran und den Makromolekülen sind verantwortlich für den Viabilitätsverlust nach der Trocknung und Lagerung. Eine Ursache für die Schädigung der Zellmembran ist auf den oben genannten Phasenübergang der Membran während des Trocknungsprozesses zurückzuführen (Santivarangkna et al., 2007), (Lievense and van't Riet, 1994). Im hydrierten Zustand befindet sich die Zellmembran in einem flüssig-kristallinen Stadium. Dieser ist gekennzeichnet durch eine dynamische Struktur, in der Makromoleküle wie eingelagerte Proteine und Lipide beweglich sind. Bei Entfernung des Wassers nähern sich die Phospholipide der Membran an, wodurch die van-der-Waals-Kräfte zunehmen. Dies führt zu einem Phasenübergang vom flüssig-kristallinen zum Gelzustand. Stoffwechselprozesse können in diesem Stadium nur noch verlangsamt ablaufen. Die Entfernung des Wassers führt zum Anstieg der Phasenübergangstemperatur  $T_m$  der Membran, zu sehen in Abbildung 2.6.



**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung eines Phasenübergangs vom flüssig-kristallinen Zustand in den Gelzustand. (Santivarangkna et al., 2008a)

Nach Higl (2008) liegt üblicherweise die Phasenübergangstemperatur von Bakterienmembranen im hydrierten Zustand bei 4 - 10 °C. Nach der Gefriertrocknung konnte Higl bei *L.paracasei* einen Anstieg der Phasenübergangstemperatur von 80 °C nachweisen. Auch Linders et al. (1997b) konnten für *L.plantarum* im hydrierten Zustand eine Phasenübergangstemperatur von 4 °C ermitteln und unabhängig der Schutzstoffe Maltose, Sorbitol und Trehalose einen Anstieg von  $T_m$  von 4 °C auf 20 °C nach der Trocknung ermitteln.

In der in Abbildung 2.6 dargestellten Gelpase liegen die Moleküle näher beieinander und die Fettsäureketten sind höher geordnet. Dies führt zu einer dicker werdenden Cytoplasmamembran. Zellmembranen bestehen aus verschiedenen Phospholipiden. Diese unterscheiden sich in ihrer jeweiligen Phasenübergangstemperatur (Santivarangkna et al., 2008a), (Santivarangkna et al., 2008b), (Crowe, 2002). Auf Grund von unterschiedlichen Wasser- und Temperaturfeldern oberhalb der Membran, findet der Phasenübergang nicht an jeder Stelle zeitgleich statt. Dadurch kann ein Teil der Membran im Gel- und der andere Teil im flüssig-kristallinen Zustand vorliegen. Dies kann wiederum negative Auswirkungen auf die Viabilität während der Lagerung mit sich bringen.

### 2.2.3 Einfluss von Trägermaterialien

Bisher existieren nur wenige Arbeiten, die sich mit der Wirbelschichttrocknung von prokaryotischen Mikroorganismen beschäftigten. Dabei wurden in allen zu diesem Thema durchgeführten Arbeiten Trägermaterialien zur Trocknung der Bakterien verwendet. Linders et al. (1997) verwendeten in ihren Experimenten zur Trocknung von *L.plantarum* das Trägermaterial Stärke, Mille et al. (2004) nutzte Caseinpulver und Strasser et al. (2009) setzte Cellulose ein. Trägermaterialien können amorphe Bestandteile enthalten, die bei der Trocknung in den Glaszustand übergehen. In diesem Glaszustand ist die molekulare Mobilität stark beeinträchtigt und es findet ein verlangsamter bis kein Stoffaustausch mit der Umgebung statt. Dies wirkt sich positiv auf die Überlebensrate und die Viabilität von Mikroorganismen nach der Trocknung und während der Lagerung aus. Die Mikroorganismen werden in eine amorphe Matrix eingebettet, welche Schutz bei der Dehydrierung und der Lagerung gibt. Dabei hängt die Stabilität der getrockneten Mikroorganismen in amorphen Zuckermatrizes zum Einen vom verwendeten Zucker und zum Anderen von dem physikalischen Zustand der Zuckermatrix ab. Je nach verwendetem Zucker variieren die stabilisierenden Effekte. Beispielsweise wird Laktose oft in Verbindung mit Magermilch eingesetzt, da sie mit Milchproteinen der Magermilch reagiert und somit die zellschädigende Maillard-Reaktion verhindert. Nicht reduzierende Disaccharide, wie Trehalose und Saccharose, sollen vor allem, laut Crowe et al. (1996) und Conrad et al. (2000), schützend für gefriergetrocknete Bakterien sein. Des Weiteren konnte in der Arbeit von Chávez and Ledebor (2007) gezeigt werden, dass nach der Sprüh- und Vakuumtrocknung von probiotischen Milchsäurebakterien die Lagerstabilität durch den Einsatz von Maltodextrin als Trägermaterial in Verbindung mit Sojaproteinen verbessert wird. Auf den Trägerstoff Maltodextrin soll nun näher eingegangen werden, da dieser von besonderem Interesse für diese Arbeit ist.

#### Maltodextrin

Das Trägermaterial Maltodextrin besitzt eine Vielzahl von positiven Eigenschaften, weshalb es sich hervorragend für die Verwendung als Energiequelle, Stabilisator, Füllmittel

und Konservierungsmittel in der Lebensmittel- und Biotechnologieindustrie eignet. Maltodextrin ist wasserlöslich und wird in der Diätetik eingesetzt, um Mahlzeiten mit Kohlenhydraten anzureichern. Zusätzlich wird Maltodextrin häufig als Trägermaterial für empfindliche und flüchtige Stoffe wie Aromen, Gewürzen und Vitamine genutzt und zeichnet sich dabei durch seine Geschmacksneutralität aus. In der Biotechnologie dient Maltodextrin zudem als Nährstoffquelle für Bakterien.

### Laktose

Das Trägermaterial Laktose zeichnet sich ebenfalls durch eine große Anzahl an positiven Attributen aus, wodurch Laktose häufig als Schutz- beziehungsweise Trägerstoff bei der Trocknung Verwendung findet (Jouppila et al., 1997), (Haque and Roos, 2004), (Kurtmann et al., 2009). Zum Einen wird Laktose als Substratquelle für die Fermentation von Milchsäurebakterien genutzt und zum Anderen zeichnet sie sich als Aromaträger aus. Sie wirkt unterstützend auf die Kalzium-Resorption und hemmt das Wachstum von Fäulnisregenern im Darm des Menschen. Des Weiteren wird sie in der Lebensmitteltechnik häufig zur Verbesserung der Textur, beispielsweise von Tiefkühlprodukten, eingesetzt.

### Zuckerpellets

Bei dem Trägermaterial Zuckerpellets handelt es sich um ein Gemisch aus Saccharose und Maisstärke. Dieses wird häufig zur Herstellung von Arzneimitteln mit konstanter beziehungsweise verzögerter Freisetzung des Wirkstoffes verwendet. Dabei finden Zuckerpellets häufig als Trägermaterialien für Coatingprozesse Anwendung. Auf Grund der Zusammensetzung der Zuckerpellets lässt sich keine eindeutige Aussage über eine möglich auftretende Maillard-Reaktion treffen. Saccharose als nicht reduzierender Zucker führt zu keiner Reaktion. Im Gegensatz dazu kann es bei Überhitzung durch das Vorhandensein von Maisstärke zu einer Reaktion kommen.

In der Tabelle 2.2 sind die für diese Arbeit relevanten Eigenschaften der verwendeten Trägermaterialien aufgelistet.

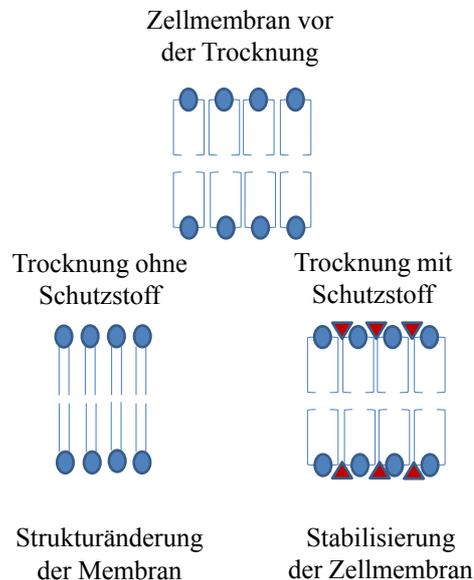
**Tabelle 2.2:** Eigenschaften von Zuckerpellets, Laktose und Maltodextrin DE 20 <sup>a</sup> (Storz, 2003), <sup>b</sup> (Roos et al., 1991a) <sup>c</sup> (Labuza et al., 1971), <sup>d</sup> (Haque et al., 2004), <sup>e</sup> (Bhandari et al., 1997), <sup>f</sup> Wirth et al., 1998

Eigenschaften	Maltodextrin DE20	Laktose	Zuckerpellets
Molare Masse	180,2 $\frac{g}{mol}$	342,3 $\frac{g}{mol}$	180,2-342,3 $\frac{g}{mol}$
Hygroskopizität	hygroskopisch <sup>a</sup>	hygroskopisch <sup>d</sup>	hygroskopisch <sup>e</sup>
Schmelzpunkt	240	223 °C	186-200 °C
Glasübergangstemperatur	141 °C <sup>b</sup>	101 °C <sup>c</sup>	52-62 °C <sup>c</sup>
Maillard-Reaktion	ja <sup>a</sup>	ja <sup>f</sup>	ja/nein

#### 2.2.4 Einfluss von Schutzstoffen

Ähnlich wie bei den Trägermaterialien können Schutzstoffe amorphe Bestandteile enthalten, die sich wiederum positiv bei der Dehydrierung und Lagerung auswirken. Schutzstoffe können die Mikroorganismen auf unterschiedlichste Art, sowohl während der Trocknung

als auch während der Lagerung, schützen. Unter anderem stabilisieren sie die Zellstruktur, indem sie mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipiddoppelmembran, zu sehen in Abbildung 2.7, interagieren und somit die Zellmembran stabilisieren.



**Abbildung 2.7:** Grafische Darstellung des stabilisierenden Einflusses von Schutzstoffen auf die Zellmembran von Mikroorganismen

Des Weiteren können Schutzstoffe als Wasserersatz genutzt werden. Einige Schutzstoffe, wie beispielsweise Trehalose, sind in der Lage, strukturelle Wassermoleküle, die hydrogen mit den Endgruppen von Proteinen verbunden sind, zu ersetzen. Dadurch bleibt die dreidimensionale Struktur der Proteinmoleküle und damit auch die volle Funktionalität der Proteine nach dem Trocknungsprozess erhalten.

Einige Schutzstoffe wirken auch als Feuchtestabilisatoren und werden dadurch bevorzugt in der Lebensmittelindustrie zur Verhinderung des Austrocknens von Lebensmitteln genutzt.

Eine weitere positive Eigenschaft von Schutzstoffen ist die Fähigkeit zur Bildung von glasartigen Festkörpern. Dabei bilden die Schutzstoffe eine amorphe, glasartige Matrix, die in der Lage ist, die Tertiärstrukturen von Proteinen und Phospholipiden zu stabilisieren und somit einen Schutz während der Trocknung darzustellen. Außerdem wird durch die glasartige Struktur die molekulare Mobilität reduziert und somit das Auftreten destruktiver physikalischer Kräfte verhindert.

Manche der in der Lebensmittelindustrie verwendeten Zuckerarten sind hygroskopisch. Meistens werden diese Zuckerarten durch das Vorhandensein von Wasserdampf klebrig. Die aus der Atmosphäre adsorbierte Feuchtigkeit geht mit den an der Oberfläche befindlichen Zuckern in Lösung. Somit erhöht sich einerseits die molekulare Mobilität und andererseits laufen Reaktionen ab, die zu einer Denaturierung der Proteine und anderer Zellbestandteile führen können. Beim Vorhandensein von Feuchtigkeit neigen Zuckermoleküle dazu in den stabileren Zustand, den Kristallzustand, überzugehen. Eine zusätzliche

Erhöhung der molekularen Mobilität kann durch die Lagerungstemperatur hervorgerufen werden. Übersteigt diese die Glasübergangstemperatur, können die Zuckermoleküle kristallisieren und unerwünschte Bräunungsreaktionen ablaufen. Im Folgenden soll explizit auf die Schutzstoffe Trehalose und Sorbitol eingegangen werden.

### **Trehalose**

Trehalose ist als eines der Primärmoleküle für die Erhaltung der Bioaktivität der Zellmembranen auf äußere Stressbedingungen, wie das Einfrieren, Trocknen oder Erhitzen verantwortlich (Roser, 1991). Es ist wie die meisten Zuckerarten in der Lage, amorphe Gele zu bilden. Diese werden Glas genannt und zeichnen sich durch eine hohe Viskosität und niedrige Mobilität aus. Trehalose in seinem Glaszustand ist hydrophil und in der Lage Wasser zu binden, wenn ein Überschuss an Wasser in dem System besteht. Somit wird die Wasseraktivität im System gesenkt. Die Entstehung vom Glaszustand erfolgt durch den Entzug von Wasser, durch Wärmeeinwirkung in der Wirbelschicht oder durch die Gefriertrocknung. Wird die Glasübergangstemperatur überschritten oder die Feuchtigkeit in der Umgebung erhöht, können die glasartigen Feststoffe klebrig beziehungsweise bei Polymeren gummiartig werden. Befinden sich die Zuckerarten in diesem zähflüssigen bis flüssigen Zustand, werden sie häufig instabil, kristallisieren oder bauen sich chemisch ab. Bei der Kristallisierung bildet sich ein Anhydrid-Zucker und die Wasseraktivität steigt. Dies wiederum geht mit einer Erhöhung der Bräunungsreaktionen einher und fördert Abbaureaktionen bei Lebensmitteln. Mit Hilfe von Trehalose kann das Wasser in der Zelle gebunden und somit die Wasseraktivität kontrolliert werden. Kristallisiert das Trehalose-Glas, entsteht meist ein Dihydrat, wodurch die Wasseraktivität vermindert wird. Trehalose stabilisiert Proteine und Lipide gegen den Zellabbau (Crowe et al., 1996), der durch die Austrocknung der Zellen hervorgerufen werden kann. Die Stabilisierung erfolgt durch die Einbettung der Proteine und anderer Zellmembranbestandteile in die von der Trehalose geformte Glasmatrix. Dadurch sind die getrockneten Proteine physikalisch an Abbaureaktionen gehindert. Trehalose weist eine der höchsten Glasübergangstemperaturen von 115 °C auf. Dadurch können Lebensmittel, die zum Teil aus Trehalose bestehen, auf Grund der hohen Glasübergangstemperatur und der Fähigkeit, freies Wasser durch die Dihydratbildung zu binden, bei höheren Temperaturen, als es bei anderen Zuckerarten üblich wäre, gelagert werden.

### **Sorbitol**

D-Sorbitol wird in vielen Lebensmitteln eingesetzt. Ein Grund dafür ist die Fähigkeit als Feuchtestabilisator zu wirken und somit das Austrocknen von Lebensmitteln zu verhindern. D-Sorbitol (E 420) ist in der Europäischen Union als Lebensmittelzusatzstoff, Süßungsmittel und Farbstoff zugelassen. Es zählt zu den in der Natur (Vogelbeeren, Weißdorn, Pflaume) vorkommenden Zuckeralkoholen, die eine ausgezeichnete Stabilität gegenüber Hitze und Säure aufweisen. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Nichtfermentierbarkeit durch zahlreiche Mikroorganismen (Rosenplenter et al., 2007). Unter anderem Linders et al. (1997a) und Carvalho et al. (2003) zeigten, dass Sorbitol einen positiven Einfluss auf die Viabilität gefrier- und wirbelschichtgetrockneter *L.plantarum* Zellen vor allem während der Lagerung nach sich zieht. Ein Grund dafür ist die Interaktion der Sorbitol-Moleküle mit der Zellmembran der Mikroorganismen. Dadurch wird die Zellmembran stabilisiert und Schäden daran verringert. Eine zusätzliche gewinnbringende Eigenschaft von Sorbitol ist seine antioxidative Wirkung, wodurch auftretende Lipid-

oxidationen bei der Trocknung und Lagerung verhindert werden (Linders et al., 1997b). Des Weiteren stabilisiert Sorbitol durch die Bildung von Sorbitol-Protein Komplexen die Proteinstruktur. Dadurch bleibt die Funktionalität der Proteine erhalten.

Zusammenfassend sind einige Eigenschaften von Trehalose und Sorbitol, die relevant für diese Arbeit sind, in der Tabelle 2.3 aufgelistet.

**Tabelle 2.3:** Eigenschaften von Trehalose und Sorbitol <sup>a</sup> (Rosenplenter, 2007), <sup>b</sup> (Ding et al., 1996)

Eigenschaften	D-Sorbitol	Trehalose-Dihydrat
Molare Masse	182,2 $\frac{g}{mol}$	378,3 $\frac{g}{mol}$
Hygroskopizität	hygroskopisch <sup>a</sup>	nicht hygroskopisch <sup>a</sup>
Schmelzpunkt	93-97 °C	97 °C
Glasübergangstemperatur	-1,5 °C <sup>a</sup>	115 °C <sup>b</sup>
Maillard-Reaktion	nein <sup>a</sup>	nein <sup>a</sup>

### 2.2.5 Wirbelschichttrocknung

Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, zählt die Wirbelschichttrocknung zu den konvektiven Trocknungsverfahren. Fu and Chen (2011) zeigen, dass diese im Vergleich zur Sprühtrocknung im Hinblick auf die Trocknung von Mikroorganismen, respektive von prokaryotischen Mikroorganismen, bisher nur wenig untersucht wurde. Generell werden bei der Wirbelschichttrocknung Feststoffpartikel in einem aufwärtsgerichteten Luftstrom in der Schwebe gehalten. Die Feststoffpartikel dienen als Trägermaterial. In diesem Schwebezustand sind die Feststoffpartikel voneinander getrennt, so dass die in die Wirbelschicht eingesprühte Flüssigkeit die Feststoffpartikel rundum bedeckt. Ein Vorteil dieses Schwebezustandes ist der intensive Wärme- und Stoffübergang zwischen den Partikeln und dem Gasstrom, der eine schnelle und schonende Trocknung erlaubt.

Im Allgemeinen werden Wirbelschichtanlagen für unterschiedliche Einsatzgebiete, wie beispielsweise zum Trocknen, Granulieren, Agglomerieren und Coaten von granularen Medien verwendet. Das Einsprühen der Flüssigkeit kann mit unterschiedlichen Verfahren erfolgen. Beim Top-Spray-Verfahren wird die Sprühflüssigkeit von oben auf die in der Schwebe gehaltenen Feststoffpartikel gesprüht. Hingegen wird im Bottom-Spray-Verfahren die Flüssigkeit von unten auf die Feststoffpartikel gesprüht. Beide Verfahren und der allgemeine Aufbau einer Wirbelschichtanlage sind schematisch in der Abbildung 2.8 dargestellt.

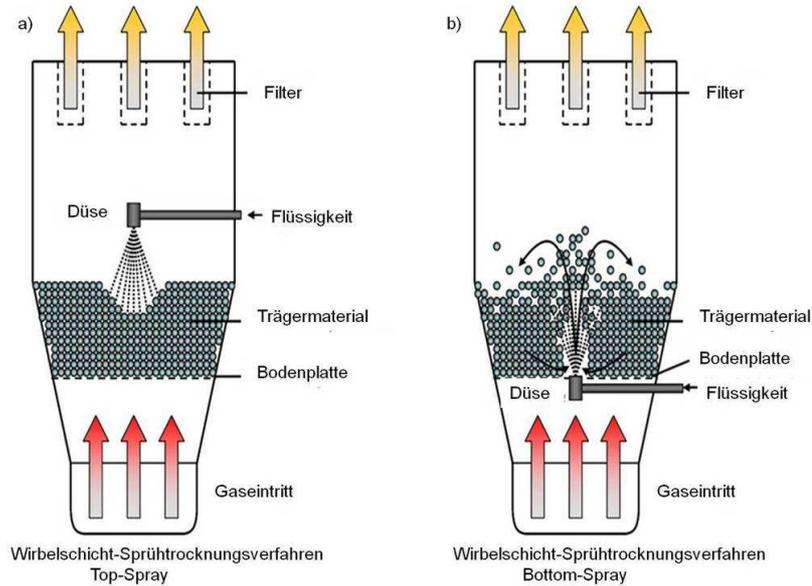
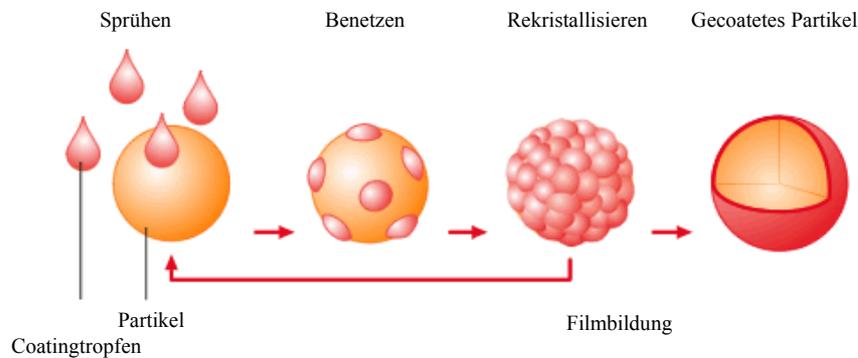


Abbildung 2.8: Top-Spray und Bottom-Spray Coating (Fries et al., 2012)

Im Rahmen dieser Arbeit werden getrocknete, prokaryotische Mikroorganismen mittels Sprühcoating in der Wirbelschicht erzeugt. Sprühcoaten kann sowohl im kontinuierlichen als auch im diskontinuierlichen Betrieb durchgeführt werden. In der Lebensmittel- und Futterindustrie wird vor allem das Top-Spray-Verfahren angewandt. Bei diesem Verfahren werden durch die Bildung eines Filmes auf dem Trägermaterial die Produkteigenschaften wie

- Produkthandling
- Fließfähig- und Löslichkeit sowie
- Lagerstabilität durch den Schutz vor Feuchtigkeit, Sauerstoff, Licht und mechanischer Beanspruchung

verbessert. Bei der Herstellung der Sprühflüssigkeit sollte darauf geachtet werden, dass diese keine zu hohe Viskosität aufweist. Stark viskose Sprühflüssigkeiten wirken der Spreitung der Flüssigkeit auf dem Material entgegen. Mitunter führen die ungleichmäßige Gutbewegung und Entfernung zur Düse zu einer porösen Filmstruktur, die sich nicht nachteilig auf die Produktqualität auswirkt. Das Sprühcoaten ist schematisch in Abbildung 2.9 zu sehen.



**Abbildung 2.9:** Sprühcoaten auf Trägermaterial in der Wirbelschicht (Glatt GmbH)

Beim Sprühcoaten werden die in der Suspension oder Lösung befindlichen Feststoffe auf ein in der Wirbelschicht zirkulierendes Trägermaterial aufgetragen und durch die Trocknung verfestigt. Es kommt zur Filmbildung, wobei die Größe des Filmes abhängig von der Verweilzeit des Trägermaterials im Sprühbereich ist. Die Trocknung erfolgt durch Verdunstung, also der Verdampfung von Wasser und durch Diffusion der Wassermoleküle in das umgebende, trocknende Gas. Die Verdampfung wird hauptsächlich durch die Gastemperatur und die Diffusion durch den Gasvolumenstrom beeinflusst. Nach der Trocknung sind im Idealfall nur noch geringe Mengen an Wasser im Produkt enthalten. Die Feststoffe aus der Sprühlösung liegen in ihren ursprünglichen Bestandteilen auf der Oberfläche des Trägermaterials vor.

### 2.3 Einfluss der Lagerung auf die Viabilität

Ein entscheidendes Qualitätsmerkmal für die Lagerung von getrockneten Mikroorganismen ist die Erhaltung der Viabilität und Aktivität der Zellen über einen bestimmten Zeitraum. Dabei sollten die getrockneten Mikroorganismen, wenn sie wieder im rehydrierten Zustand vorliegen, die ursprüngliche Viabilität und Aktivität aufweisen. Da Viabilitätsverluste sowohl während der Trocknung als auch während der Lagerung auftreten, sollen die für die Lagerung viabilitätsbestimmenden Faktoren in diesem Abschnitt genannt und erläutert werden. Morgan et al. (2006), Meng et al. (2008) und Strasser et al. (2009) untersuchten den Einfluss von Lagerungstemperaturen, -zeit, Wassergehalt, Trägermaterialien und Schutzstoffen. In den Arbeiten konnte festgestellt werden, dass mit steigender Lagerungstemperatur die Viabilitätsverluste der getrockneten Mikroorganismen zunehmen. Hingegen konnte festgestellt werden, dass niedrige Lagerungstemperaturen in Höhe von 4 °C

keinen Einfluss auf die Viabilität haben. Somit können getrocknete Mikroorganismen bedenkenlos bei dieser Temperatur gelagert werden. Ein Grund für den Verlust der Viabilität im höheren Temperaturbereich ist der natürliche Abbau von lebenswichtigen Makromolekülen, wie Proteinen und Fetten, die während der Lagerung denaturiert und oxidiert werden. Im Falle von niedrigen Lagerungstemperaturen kommt es nicht zu einem derartigen Abbau.

Auch Vorbehandlungen der Zellen durch Stressinduktionen oder dem Einsatz von Schutzstoffen während der Fermentation oder vor der Trocknung wirken sich positiv auf die Viabilität während der Lagerung aus. Wie bereits in Abschnitt 2.2.4 erläutert, können Schutzstoffe unter anderem als Feuchtestabilisatoren genutzt werden. Demnach bleiben die nach der Trocknung erreichten niedrigen Wassergehalte im Produkt während der Lagerung erhalten. Dies führt zur Hemmung von Fäulnisreaktionen in den Lebensmitteln und verhindert Phasen- und Zustandsänderungen der Zellmembran und Zelle.

### 2.3.1 Glaszustand

Allgemein betrachtet handelt es sich bei den Bestandteilen von Mikroorganismen um Feststoffe, die im gelösten, festen kristallinen oder amorphen Zustand vorkommen. Im kristallinen Zustand befinden sich die Moleküle im thermodynamischen Gleichgewicht und liegen geordnet vor. Im Gegensatz dazu liegen sie im amorphen Zustand im Ungleichgewicht vor und sind ungeordnet. Bei der Trocknung von Mikroorganismen wird davon ausgegangen, dass die amorphen Bestandteile der Zellen, zu denen Kohlenhydrate und Proteine (Slade et al., 1991) sowie Wasser gehören, durch den Wasserentzug in einen Glaszustand übergehen. In diesem Zustand ist die Viskosität in den Zellen hoch. Gemäß Downton et al. (1982) liegt sie im Glaszustand bei  $10^{12} Pa \cdot s$ . Dadurch ist die molekulare Mobilität stark beeinträchtigt und chemische sowie physikalische Reaktionen können nur noch verlangsamt ablaufen.

Werden die Mikroorganismen bei hohen Temperaturen und Umgebungsfeuchten gelagert, führt dies zu Phasen- und Zustandsänderungen in den Zellen. Solche Änderungen der Phasen und Zustände gehen einher mit Änderungen der molekularen Mobilität und Stabilität. Die Zellen gehen vom glasartigen in einen flexiblen Zustand über, bei dem sich die Viskosität auf  $10^6 - 10^8 Pa \cdot s$  verringert. Dadurch steigt die molekulare Mobilität an und chemische sowie physikalische Reaktionen laufen wieder ab. Gemäß Roos and Karel (1991a) nimmt mit kleiner werdender Viskosität die molekulare Mobilität stark zu. Daher besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Viskosität und der Diffusionsmöglichkeit der Moleküle. Dieser Zusammenhang wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung für die Translation  $D_{trans}$  und Rotation der Moleküle  $D_{rot}$  wie folgt beschrieben:

$$D_{trans} = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (2.6)$$

$$D_{rot} = \frac{k_B T}{8\pi\eta r^3} \quad (2.7)$$

- $k_B$  [J/K]: Boltzmannkonstante
- $T$  [K]: Temperatur
- $\eta$  [ $N \cdot s \cdot m^{-2}$ ] dynamische Viskosität des Lösungsmittels
- $r$  [m]: Hydrodynamischer Radius der diffundierenden Teilchen.

Wie aus den Gleichungen 2.6 und 2.7 zu erkennen ist, sind die Diffusionskoeffizienten  $D_{trans}$  und  $D_{rot}$  umgekehrt proportional zur Viskosität. Mit sinkender Viskosität erhöht sich demnach die Diffusion der Moleküle.

Der Übergang vom Glaszustand in den flexiblen Zustand wird als Glasübergang bezeichnet und mit Hilfe der Glasübergangstemperatur  $T_g$  beschrieben. Diese ist stoffspezifisch und hängt vom Wassergehalt, dem Massenanteil der jeweiligen Komponenten und der chemischen Zusammensetzung des Stoffsystems ab. Für die Berechnung der Glasübergangstemperatur eines binären Gemisches, bestehend aus Wasser und dem gelösten Stoff, wird die Gordon-Taylor-Gleichung herangezogen (Gordon and Taylor, 1952). Dies ist eine nicht-lineare Funktion und wie folgt definiert:

$$T_g = \frac{x_1 T_{g1} + k x_2 T_{g2}}{x_1 + k x_2} \quad (2.8)$$

- $T_g$  [°C]: Glasübergangstemperatur
- $x_i$  [kg/kg]: Massenanteile der jeweiligen Komponenten
- $T_{gi}$  [°C]: Glasübergangstemperatur der einzelnen Komponenten.

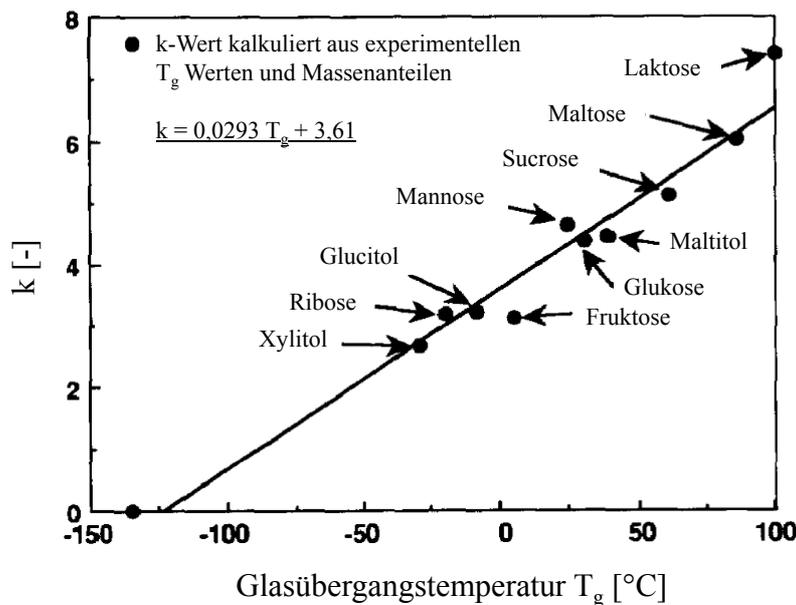
Der Ausdruck  $x_1$  steht für den Feststoffanteil und  $x_2$  für den Wasseranteil. Die Konstante  $k$  ist ein experimentell bestimmter Wert und kann mit Hilfe der Beziehung

$$k = \frac{\Delta C_{p2}}{\Delta C_{p1}} \quad (2.9)$$

ermittelt werden, wobei  $\Delta C_{p2}$  die Änderung der Wärmekapazität des Wassers und  $\Delta C_{p1}$  jene des Feststoffes ist. Sollte die Konstante  $k$  experimentell nicht bestimmt werden können, liegen in der Literatur zahlreiche Tabellen mit  $k$ -Werten für unterschiedliche Kohlenhydrate vor. Vor allem die Arbeit von Roos (1993) sei in diesem Zusammenhang zu nennen. Bhandari and Howes (1999) stellten in ihren Arbeiten fest, dass Kohlenhydrate einen größeren Einfluss auf die Glasübergangstemperatur  $T_g$  haben als Proteine.

Die Komplexität der Mikroorganismen erlaubt es nicht ohne weiteres, die Glasübergangstemperatur dieser einzeln zu messen. Bisher existieren dazu lediglich die Arbeiten von Fonseca et al. (2004) und Higl (2008), die die Glasübergänge von *Lactobacillus bulgaricus CFL1* und *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* mittels Differential Scanning Calorimetry (DSC) untersuchten. Beide konnten keine Glasübergänge in den jeweiligen Temperaturbereichen von -120 bis 80 °C und von -80 bis 120 °C bei den getrockneten Mikroorganismen erkennen. Ausschließlich durch die Anwesenheit von Kohlenhydraten, im Fermentationsmedium beziehungsweise im Trägermaterial oder Schutzstoff, wird ein Sprung bei der  $T_g$ -Messung bewirkt, der auf die tatsächliche Glasübergangstemperatur hindeutet.

Dadurch werden bei der Berechnung der Glasübergangstemperatur von Stoffgemischen, in denen Mikroorganismen enthalten sind, diese vernachlässigt und für die Konstante  $k$ , die experimentell ermittelten oder die aus der Literatur bekannten  $k$ -Werte für Kohlenhydrate verwendet. Roos (1993) entdeckte einen linearen Zusammenhang zwischen der wasserfreien Glasübergangstemperatur und dem  $k$ -Wert einzelner Kohlenhydrate, zu sehen in Abbildung 2.10.



**Abbildung 2.10:** Experimentell ermittelte  $k$ -Werte unterschiedlicher Kohlenhydrate als Funktion ihrer wasserfreien Glasübergangstemperatur  $T_g$ . Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden beträgt 0,959 (Roos, 1993)

Mit Hilfe der Regressionsgeraden  $k = 0,0293T_g + 3,61$  können die  $k$ -Werte für verschiedene Zuckerarten bei Kenntnis der wasserfreien Glasübergangstemperatur  $T_g$  ermittelt werden.

Couchman and Karasz (1978) erweiterten die Gordon-Taylor-Gleichung unter Berücksichtigung der Änderung der spezifischen Wärmekapazität der unterschiedlichen Komponenten und ersetzen die Konstante  $k$  aus der Gordon-Taylor-Gleichung mit dem Verhältnis der Änderungen der Wärmekapazitäten der Komponenten:

$$T_g = \frac{x_1 T_{g1} + \frac{\Delta C_{p2}}{\Delta C_{p1}} x_2 T_{g2}}{x_1 + \frac{\Delta C_{p2}}{\Delta C_{p1}} x_2}. \quad (2.10)$$

Somit kann die Couchman and Karasz (1978)-Gleichung auf Mehrkomponentensysteme wie Wasser, Glukose und Saccharose (Roos, 1995) in der Form

$$T_g = \frac{\sum_{i=1}^n \Delta C_{pi} x_i T_{gi}}{\sum_{i=1}^n x_i \Delta C_{pi}} \quad (2.11)$$

angewandt werden.

Wasser, als eine Hauptkomponente in einem Stoffsystem, besitzt eine sehr niedrige Glasübergangstemperatur von  $T_g = -135^\circ\text{C}$  (Johari et al., 1987). Werden die getrockneten Mikroorganismen nicht in Vakuumverpackungen gelagert, findet ein stetiger Stoffaustausch mit der Umgebung statt. Die Folge ist eine zunehmende Wasseraufnahme der Probe, wodurch der Massenanteil an Wasser so lange ansteigt, bis sich ein Feuchtgleichgewicht mit der Umgebung einstellt. Auf Grund des niedrigen Wertes der Glasübergangstemperatur von Wasser sinkt diese mit zunehmender Wasseraufnahme ab, wodurch die Lagerstabilität der getrockneten Mikroorganismen beeinträchtigt wird. Bei der Herstellung von Lebensmitteln wird zunehmend darauf geachtet, Stoffe einzusetzen, die eine hohe Glasübergangstemperatur besitzen und somit den Einfluss des niedrigen Wertes der Glasübergangstemperatur von Wasser ausgleichen. Laut Bhandari et al. (1997) ist Maltodextrin das am häufigsten verwendete Trägermaterial in der Lebensmittelherstellung. Es zeichnet sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Dextrose-Äquivalent durch seine hohe Glasübergangstemperatur, die zwischen  $100 - 243^\circ\text{C}$  (für Stärke) liegt, aus. Gemäß Roos and Karel (1991b) steigt mit abnehmendem Dextrose-Äquivalent die Glasübergangstemperatur von Stoffgemischen an. Mit kleiner werdendem Dextrose-Äquivalent steigt die Molmasse des jeweiligen Zuckers. Demnach erhöhen Zucker mit einer hohen Molmasse die Glasübergangstemperatur. Roos and Karel (1991b) beschreiben den Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur und Molmasse als:

$$T_g = T_g^\infty - \frac{K_m}{M}. \quad (2.12)$$

Hierbei steht  $T_g^\infty$  für die Glasübergangstemperatur von der höchsten Molmasse. Im Falle von Maltodextrin handelt es sich dabei um Stärke mit  $T_g = 243^\circ\text{C}$ .  $K_m$  ist eine Konstante und beträgt für Maltodextrin  $52800 \text{ g}\cdot\text{K}/\text{mol}$  (Roos and Karel, 1991b).  $M$  ist die Molmasse von Maltodextrin. In Tabelle 2.4 sind einige Trägermaterialien mit den dazugehörigen Molmassen und Glasübergangstemperaturen aufgelistet.

**Tabelle 2.4:** Unterschiedliche Zucker mit deren Molekulargewicht und Glasübergangstemperatur <sup>a</sup> (Roos et al., 1991a), <sup>b</sup> (Roos, 1993)

Trägermaterial	Molmasse (g/mol)	$T_g(^{\circ}C)^{ab}$
Fruktose	180	5
Glukose	180	31
Galaktose	180	32
Sucrose	342	62
Maltose	342	87
Laktose	342	101
Maltodextrin		
DE 36	500	100
DE 25	720	121
DE 20	900	141
DE 10	1800	160
DE 5	3600	188
Stärke		243

Amorphe Materialien, die unterhalb der Glasübergangstemperatur gelagert werden, sind auf Grund der höheren Viskosität und der reduzierten molekularen Mobilität im Glaszustand stabiler als im flexiblen Zustand (Slade et al., 1991). Demnach werden durch die verringerte molekulare Mobilität die natürlichen Abbaureaktionen der Mikroorganismen verlangsamt und die Lagerstabilität bleibt erhalten. Werden die Produkte oberhalb der Glasübergangstemperatur gelagert, verändern sich die Materialeigenschaften, was mit einem exponentiellen Anstieg der Mobilität verbunden und einer Abnahme der Viskosität einhergeht (Roos, 1995). Im Produkt kann es zu Bräunungsreaktionen, Verklebungen und Agglomerationen kommen, die sich nachteilig auf die Produktstabilität auswirken und zu Viabilitäts- beziehungsweise Aktivitätsverlusten der Mikroorganismen führen. Die Glasübergangstemperatur von amorphen biologischen Stoffsystemen dient somit als Anhaltspunkt für eine empfohlene Lagerungstemperatur.

Ein weiterer Grund für den Viabilitätsverlust während der Lagerung ist die natürliche Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen. Bei unzureichender Trocknung, das bedeutet bei zu hohen Restwassergehalten, sind die Stoffwechselprozesse verlangsamt, jedoch nicht gestoppt. Demnach finden in den Zellen während der Lagerung weiterhin Stoffwechsel mit einer geringeren Reaktionsrate statt, was wiederum zum schleichenden Absterben der Zellen führt.

Ein zusätzlicher viabilitätsbestimmender Faktor ist die Rehydrierung der Zellen, in der sie im Gegenzug zur Trocknung abermals osmotischem Stress ausgesetzt sind. Rehydrierung kann zu Brüchen in der Zellmembran und somit zum Verlust von lebenswichtigen Makromolekülen führen. Eine langsame Rehydrierungsrate wird demnach empfohlen (Poirier et al., 1999). Auch die Rehydrierungstemperatur hat einen Einfluss auf die Viabilität der Mikroorganismen. Mille et al. (2004) fanden für *L.plantarum* eine optimale Rehydrierungstemperatur von 20 bis 37 °C. Hingegen bei *L.bulgaricus* optimale Rehydrierungstemperaturen sowohl bei 30 als auch bei 37 °C ermittelt wurden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Viabilitätsverluste, ähnlich wie bei der Trocknung, durch eine Vielzahl von Faktoren hervorgerufen werden. Diese können je nach Mikroorganismus, Kultivierungsbedingungen, Schutzstoffen, Trägermaterialien, Lagerungstemperatur, Restwassergehalt, Wasseraktivität und Rehydrierungsbedingungen unterschiedlich hoch sein. Auf die Wasseraktivität wird im Folgenden näher eingegangen.

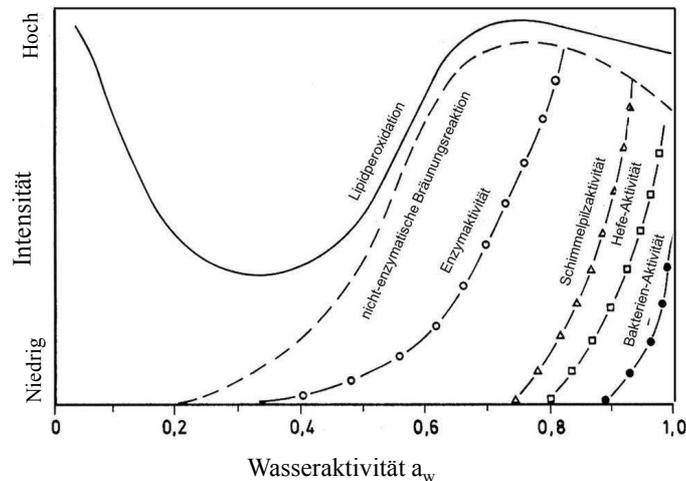
### 2.3.2 Wasseraktivität

Der Wasseraktivitätswert  $a_w$  spielt eine große Rolle in der Lebensmittelverfahrenstechnik und ist eine wichtige Größe für die Haltbarkeit von Lebensmitteln. Dabei beschreibt die Wasseraktivität die Menge des freien, nicht gebundenen Wassers, die die Lagerstabilität und die Produkteigenschaften erheblich beeinflusst. Die Wasseraktivität ist als Quotient des Wasserdampfdruckes über dem Lebensmittel ( $p$ ) und dem Wasserdampfdruck von reinem Wasser ( $p_0$ ) bei einer bestimmten Temperatur

$$a_w = \frac{p}{p_0} \quad (2.13)$$

definiert und kann Werte zwischen null und eins annehmen. Der Wert null bedeutet, dass das Lebensmittel absolut wasserfrei ist, wohingegen der Wert eins für reines Wasser steht. Die Herabsetzung der Wasseraktivität erfolgt durch Trocknung, Gefrieren oder Zugabe von Substanzen wie Zucker und Salzen. Das mikrobielle Wachstum sowie Reaktionen, die von Enzymen katalysiert werden, verlangsamen sich. Auch der Befall von unerwünschten Keimen wird dadurch unterdrückt und Fäulnisreaktionen werden verhindert.

Gemäß Teixeira et al. (1995) werden für die Lagerung von getrockneten Produkten Wasseraktivitäten von 0,2 - 0,3 empfohlen. Die Wirbelschichttrocknung und gegebenenfalls eine nachgeschaltete Nachrocknung sind darauf einzustellen (Uhlemann and Mörl, 2000). Liegen die Werte unterhalb von 0,2, kann sich dies nachteilig auf die Qualität der Lebensmittel auswirken, da hier die Lipidoxidation mit sinkendem Wasseraktivitätswert zunimmt. Diese Zunahme ist schematisch in Abbildung 2.11 dargestellt. Verschiedene Wege der Lipidoxidation führen zur oxidativen Degradation von Lipiden und verursachen Zellschädigungen. Bei Wasseraktivitäten  $> 0,4$  nehmen nichtenzymatische Bräunungsreaktionen, Maillard-Reaktionen, bis zu einem Wert von 0,6 bis 0,7 zu. Diese führen zu deutlichen Qualitätsverlusten durch den Abbau von Inhaltsstoffen. Wasseraktivitätswerte über 0,6 führen zum Anstieg der Enzymaktivität und beschleunigen wiederum Stoffwechselfvorgänge. Zudem können sich ab einer Wasseraktivität von 0,7 Schimmelpilze, Hefen und unerwünschte Bakterienstämme vermehren. In Abbildung 2.11 sind alle Wasseraktivitätsbereiche mit den zugehörigen Reaktionsintensitäten nach Labuza and Dugan (1971) dargestellt.

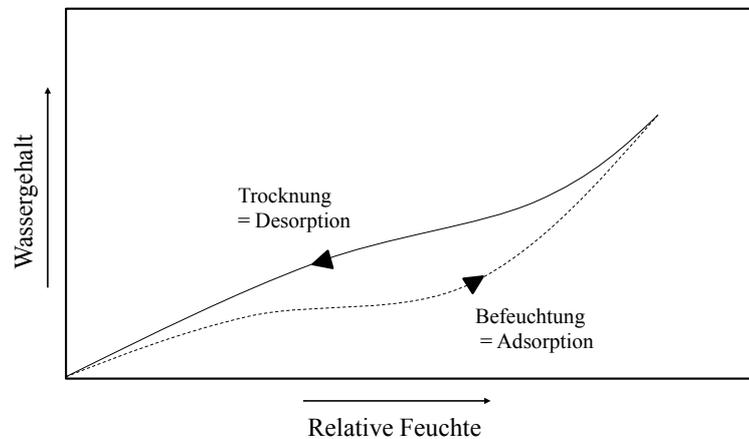


**Abbildung 2.11:** Einfluss der Wasseraktivität auf das Verderben von Lebensmitteln (Labuza et al., 1971)

### 2.3.3 Sorptionsisotherme

Sorptionsisothermen werden in der Lebensmittelindustrie genutzt, um die Produkteigenschaften von Materialien vorauszusagen und Grenzen für den Stabilitätsbereich, die entscheidend für die Lagerung von bioaktiven Materialien sind, festzulegen. Dabei stellen Sorptionsisothermen den Zusammenhang zwischen dem Wassergehalt eines Materials und der relativen Feuchte des umgebenden Gases bei vorgegebener Temperatur im Gleichgewichtszustand dar.

Die Anwesenheit von Wasser in einem Material bewirkt einen Wasserdampfdruck auf der Materialoberfläche. Entspricht dieser Wasserdampfdruck dem Dampfdruck der umgebenden Luft, steht das Material im Feuchtgleichgewicht mit seiner Umgebung. Jeder Unterschied im Wasserdampfdruck zwischen Material und umgebender Luft führt zu einem Wasseraustausch, was eine Änderung des Wassergehaltes im betreffenden Material zur Folge hat. Der Wassergehalt im Material ändert sich so lange, bis das Feuchtgleichgewicht wieder erreicht ist. Unter Feuchtgleichgewicht eines Materials versteht man also diejenige relative Feuchte, die in der umgebenden Atmosphäre herrschen muss, damit kein Wasseraustausch mit der Umgebung stattfindet. Im Feuchtgleichgewicht kann die Beziehung zwischen Wassergehalt und relativer Feuchte eines Materials durch eine Sorptionsisotherme grafisch dargestellt werden. Für jede relative Feuchte zeigt die Sorptionsisotherme den Wassergehaltswert eines Materials bei einer gegebenen konstanten Temperatur. Das Sorptionsverhalten ändert sich, wenn sich Zusammensetzung und Temperatur des Materials verändern (Uhlemann and Mörl, 2000). Auf Grund ihrer Komplexität müssen Sorptionsisothermen experimentell bestimmt werden und lassen sich, wie in Abbildung 2.12 dargestellt, in Adsorptions- und Desorptionsisothermen einteilen.



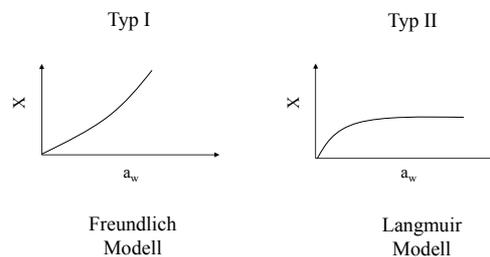
**Abbildung 2.12:** Schematische Darstellung einer Sorptionsisotherme bestehend aus Adsorptions- und Desorptionsisotherme (Uhlemann et al., 2000)

Adsorptionsisothermen beschreiben das Verhalten eines Materials während der Lagerung, wohingegen Desorptionsisothermen eine Grundlage für den Trocknungsprozess darstellen. Bei der Adsorption wird ein nicht beladener Sorbent in Kontakt mit einer in der Gasphase oder Lösung befindlichen Stoffmenge mit dem Partialdruck  $p$  gebracht. Die sich in der Gasphase oder in Lösung befindenden Moleküle lagern sich zum Beispiel durch Diffusion an der Oberfläche des Sorbents an. Dabei wird je nach Stärke der Bindung Energie frei, die sogenannte Adsorptionenthalpie.

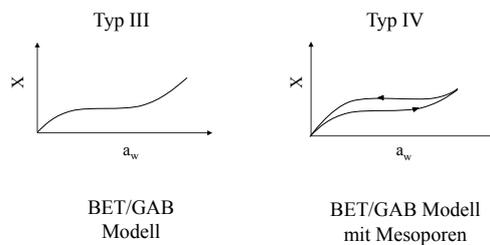
Bei der Desorption wird ein beladener Sorbent mit einem nicht beladenen Fluid in Verbindung gebracht. Die zuvor adsorbierten Moleküle besitzen ausreichend Energie, um die Oberfläche unter Aufbringung der Adsorptionenthalpie wieder zu verlassen und in die Gasphase zurückzukehren. Ein Adsorptionsgleichgewicht bei gegebener Temperatur und Partialdruck ist dann erreicht, wenn sich Adsorption und Desorption gegenseitig kompensieren und die Belegung der Festkörperoberfläche konstant bleibt. Mit größer werdendem Partialdruck lagern sich immer mehr Moleküle an der Festkörperoberfläche an, bis sich an dieser eine vollständige Schicht ausbildet. Diese monomolekulare Schicht wird als Monolayer bezeichnet. Werden die Partialdrücke weiter erhöht, adsorbieren weitere Moleküle aus der Gasphase oder einer Lösung an der Festkörperoberfläche und es bilden sich Mehrfachlagen aus. Dies erfolgt in dem Bereich zwischen  $0,2 \leq \phi \leq 0,6$ . Bei höheren Partialdrücken bildet sich ein Flüssigkeitsfilm in den Poren des Materials. In diesen schmalen Poren ist der Wasserdampfdruck auf Grund der gekrümmten Wasseroberfläche reduziert und die Kapillarkondensation gewinnt zunehmend an Bedeutung.

Laut Passot et al. (2012) und Roos (1993) lassen sich biologische Materialien dauerhaft lagern, wenn der Wassergehalt der Materialien gleich dem Wassergehalt der Monoschicht ist. Die Optimierung der Desorption zum Erreichen dieses Wassergehaltes und die sich daraus abzuleitenden Lagerungsbedingungen setzen die Kenntnis über das Sorptionsverhalten der eingesetzten Materialien voraus, das entsprechend für jedes Stoffsystem bestimmt werden muss.

Wie bereits beschrieben, werden Adsorptionsisothermen genutzt, um bei der Lagerung ausgehend von den vorherrschenden Umgebungsbedingungen, wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur, den Wassergehalt von Materialien vorauszusagen. Im Hinblick auf die Haltbarkeit von biologischen Materialien sollten je nach Material bestimmte Wassergehalte vorliegen und die Lagerungsbedingungen danach ausgerichtet werden. Zur Berechnung der Monolayer-Beladung dienen mathematische Modelle, welche die Adsorptionseigenschaften des jeweiligen Materials berücksichtigen. Laut Figura (2004) lassen sich die am häufigsten vorkommenden Adsorptionsisothermen in vier Typen einteilen. Jeder Adsorptionstyp in der Abbildung 2.13 kann durch ein unterschiedliches mathematisches Modell beschrieben werden.



(a) Freundlich und Langmuir Modell



(b) BET/GAB und BET/GAB Modell mit Mesoporen

**Abbildung 2.13:** Darstellung der vier am häufigsten vorkommenden Sorptionsisothermen

Das Freundlich-Modell wird häufig bei niedrigen Partialdrücken gefunden und durch den Typ I beschrieben. Erhöhen sich die Partialdrücke, eignen sich zur Beschreibung die Typen II, III und IV, die sogenannten Langmuir-, BET- und GAB-Modelle (Figura, 2004).

Das Langmuir-Modell zählt zum Typ II und beschreibt das Sorptionsverhalten von diversen Lebensmitteln. Es ist gekennzeichnet durch eine Abflachung der Isotherme bei

höheren Partialdrücken. Dies wird mit einer Sättigung an der Festkörperoberfläche erklärt, bei der ein Adsorptionsgleichgewicht herrscht und die Adsorptions- beziehungsweise Desorptionsgeschwindigkeiten gleich groß sind. Beim Langmuir-Modell wird von einer homogenen Festkörperoberfläche ausgegangen, auf der maximal eine monomolekulare Schicht adsorbiert werden kann, welche einer Massenbeladung von  $M_{max}$  entspricht. Bei Mehrschichtadsorption wird statt des Langmuir-Modells das BET-Modell nach Brunauer et al. (1938) angewandt. Das BET-Modell zählt, wie das GAB-Modell, zum Typ III und ist charakteristisch für Stoffe mit einer signifikant hohen Anzahl an kompatiblen und löslichen Komponenten, wie Zucker und Salzen. Die zugehörige Isotherme, zu sehen in Abbildung 2.13, ist gekennzeichnet durch einen sigmoiden Verlauf und wird mathematisch durch die BET-Gleichung beschrieben:

$$X = \frac{CM_{max} \cdot a_w}{(1 - a_w)(1 - a_w + Ca_w)}. \quad (2.14)$$

Der Faktor C ist die BET-Konstante und  $M_{max}$  beschreibt den Monolayer-Wassergehalt in  $kg \cdot kg_{T_s}^{-1}$ .

Im BET-Modell wird der  $a_w$ -Wert-Bereich von 0,05 bis 0,6 abgedeckt. Bei  $a_w \geq 0,6$  fangen Poren an, sich mit Kapillarwasser zu füllen. Somit erfolgt in diesem Größenbereich die Adsorption der Wassermoleküle einzig durch die Kondensationsenthalpie.

Bei höheren Wasseraktivitätswerten bis hin zu  $a_w = 0,9$  wird das GAB-Modell nach Guggenheim-Andersen-De Boer angewandt (Passot et al., 2012). Im Gegensatz zum BET-Modell werden beim GAB-Modell die Adsorptionseffekte der Mehrfachlagen zur Festkörperoberfläche durch den Faktor L berücksichtigt, da die Mehrfachlagen eine geringe Bindungsenthalpie zur Festkörperoberfläche aufweisen. Die GAB-Gleichung ist eine drei-Parameter-Gleichung und wie folgt definiert:

$$X = \frac{CLM_{max} \cdot a_w}{(1 - La_w)(1 - La_w + CLa_w)}. \quad (2.15)$$

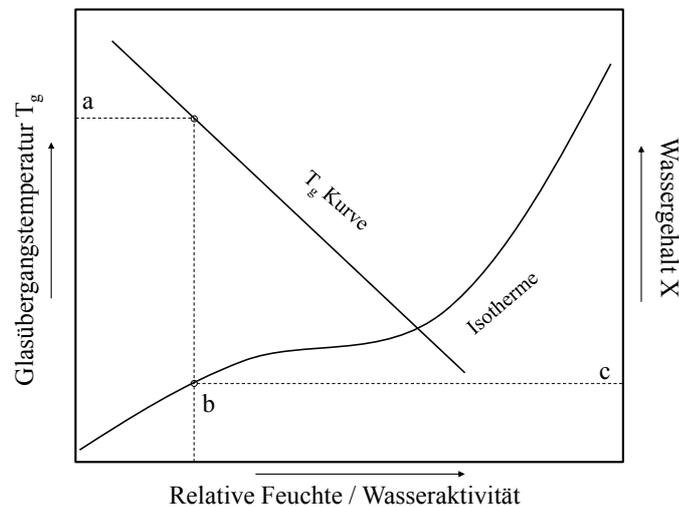
Der Faktor C ist die Guggenheim-Konstante, L der GAB-Korrekturfaktor und  $M_{max}$  abermals der Monolayer-Wassergehalt in  $kg \cdot kg_{T_s}^{-1}$ . Für  $L = 1$  geht die GAB-Gleichung in die BET-Gleichung über. Somit ist die BET-Gleichung ein Spezialfall der GAB-Gleichung. Die Temperaturabhängigkeit der BET- und GAB-Konstanten C liefert eine Aussage über die Sorptionsenthalpie des Monolayers. Zusätzlich lassen sich durch den Korrekturfaktor L Informationen zur Bindung von Mehrfachlagen aus der Temperaturabhängigkeit gewinnen.

Mit Hilfe von BET- und GAB-Gleichungen können Haltbarkeiten und Lagerfähigkeiten von biologischen Materialien besser eingeschätzt werden. Zudem werden Bedingungen formuliert, welche die Optimierung der Trocknung hinsichtlich der Verringerung der Wasseraktivität, des „freien Wassers“, auf einen bestimmten Wert, beinhalten. Durch die Bestimmung des Monolayer-Wassergehaltes sind die Wassergehalte bekannt, bei denen

biologische Materialien ohne Viabilitäts- oder Aktivitätsverlust gelagert werden können.

### 2.3.4 Zustandsdiagramme

Zustandsdiagramme werden erstellt, um die unterschiedlichen physikalischen Zustände von Materialien zu beschreiben. Dabei werden Materialzusammensetzung und Temperatur in Beziehung gesetzt. Werden zusätzlich Sorptionsisothermen berücksichtigt, dienen die Zustandsdiagramme der Beurteilung der Produktstabilität von getrockneten biologischen Materialien (Roos and Karel, 1991a), (Jouppila and Roos, 1994), (Jouppila et al., 1997). Der Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur, Wassergehalt und Wasseraktivität ist in der Abbildung 2.14 dargestellt.



**Abbildung 2.14:** Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur, Wassergehalt und Wasseraktivität. Bei einer kritischen Lagerungstemperatur  $a$  ergibt sich die dazugehörige Wasseraktivität  $b$  und der Wassergehalt  $c$ . (abgeändert von Santivarangkna et al., 2011)

Ausgehend von einer bestimmten Lagerungstemperatur kann die dazugehörige Wasseraktivität durch die  $T_g$ -Kurve im Zustandsdiagramm abgelesen werden. Von dieser Wasseraktivität wird über die Sorptionsisotherme der kritische Wassergehalt bestimmt. Roos (1987) und Fonseca et al. (2001) ermittelten einen linearen Zusammenhang zwischen der Wasseraktivität  $a_w$  und der Glasübergangstemperatur  $T_g$ . Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Jouppila and Roos (1994), die einen sigmoidalen Zusammenhang angeben. Bezüglich der vorliegenden Arbeit soll in Anlehnung an Abbildung 2.14 ein Zustandsdiagramm für das hier vorliegende Stoffsystem, bestehend aus Trägermaterial und Bakterium, erstellt und daraus die Produktstabilität abgelesen werden.

# Kapitel 3

## Experimentelle Untersuchungen

### 3.1 Arbeitslösungen und Puffer

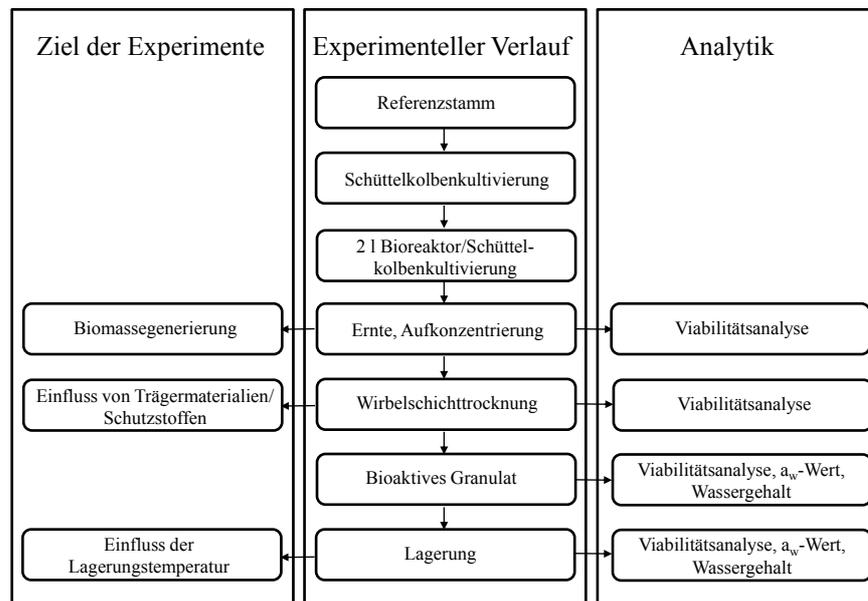
Alle relevanten Arbeitslösungen und Puffer sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

**Tabelle 3.1:** Eingesetzte Chemikalien mit den dazugehörigen Herstellern und Artikelnummern

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
Natriumhydroxid	Carl Roth	6771.2
Salzsäure	Carl Roth	N076.1
MRS-Boullion, pH 5.7	Carl Roth	HP64.1
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth	5210.2
Natriumchlorid	AppliChem	A 4661,100
Roti <sup>®</sup> -Stock 10 x PBS	Carl Roth	1058.1
Methanol dry	Carl Roth	T193.1
Hydranal Wasser Standard	Sigma Aldrich	34693
D-Sorbitol	Carl Roth	6213.1
Trehalose-Dihydrat	King Food	
Granadex <sup>™</sup> M 20 P (Maltodextrin)	Biesterfeld Spezialchemie GmbH	

### 3.2 Ablauf der Untersuchungen

Für das nähere Verständnis ist in Abbildung 3.1 der experimentelle Versuchsablauf vom Mikroorganismus zum bioaktiven Granulat mit den dazugehörigen Analysen und Zielen dargestellt. Die Versuchsreihen beginnen mit dem Referenzstamm, der von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen wird. Ausgehend vom Referenzstamm werden Masternähragarplatten angefertigt, auf denen zunächst die Bakterienkolonien wachsen. Diese Bakterienkolonien werden für die Vorkultivierung im Schüttelkolben genutzt. Diese stellen die Grundlage für die Herstellung der Hauptkultur dar. Dabei wird die Vorkultur, die zum Animpfen der Hauptkultur verwendet wird, als Inokulum bezeichnet. Die Hauptkultivierung erfolgt jeweils im



**Abbildung 3.1:** Gesamtübersicht der Vorgehensweise zur Herstellung von bioaktiven Granulaten mit zugehöriger Zielstellung und Analyse

Schüttelkolben und Bioreaktor. Nach Beendigung der Hauptkultivierung werden die Mikroorganismen geerntet, gekühlt, aufkonzentriert und für die Granulierung und Trocknung in der Wirbelschicht vorbereitet.

Die Vorbereitung umfasst das Erstellen einer Bakteriensuspension, bestehend aus der geernteten Biomasse, dem Phosphatpuffer und gegebenenfalls einem Schutzstoff. Nach Beendigung der Vorbereitung wird die Bakteriensuspension für eine definierte Zeit in die Wirbelschichtanlage auf fluidisiertes Trägermaterial gesprüht und im Anschluss getrocknet. Vom entstandenen, getrockneten, bioaktiven Granulat werden die Überlebensrate, der  $a_w$ -Wert und der Wassergehalt  $X_a$  nach der Trocknung bestimmt. Im Anschluss an die Trocknung folgen die Lagerungsexperimente. Die Lagerung der Granulate erfolgt bei Raumtemperatur und 4 °C für maximal sechs Monate. In diesem Zeitraum wird die Überlebensrate der Bakterien in den ersten vier Wochen nach sieben, 14 und 28 Tagen bestimmt. Nach Ablauf der vier Wochen erfolgt die Bestimmung monatlich. Am Ende der Lagerungszeit werden sowohl der  $a_w$ -Wert als auch der Wassergehalt  $X_e$  erneut ermittelt.

### 3.3 Bakterienstämme

Als Modellorganismus für diese Arbeit dient zunächst der Bakterienstamm *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* DSMZ 20174<sup>T</sup>. Dieser zählt zu den stressresistenten Bakterienstämmen (Kleerebezem et al., 2003) und wird daher für die ersten Granulierungsexperimente verwendet. Mit Hilfe von *L. plantarum* werden Prozessparameter für die Niedertemperaturgranulierung identifiziert, bei denen die Überlebensrate nach der Trocknung am höchsten ist.

Für die Überprüfung der Übertragbarkeit dieser Prozessparameter auf andere milchsäureproduzierende Mikroorganismen wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein zweiter Bakterienstamm, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DGCC 2132, getestet.

## 3.4 Kultivierung

In diesem Abschnitt werden die Methoden zur Kultivierung von *L.plantarum* und die Herstellungsverfahren der dafür benötigten Gebrauchsmaterialien beschrieben.

### 3.4.1 Medium

Als Fermentationsmedium für *L.plantarum* wird die MRS-Bouillon pH 5,7 der Fa. Carl Roth verwendet. Dieses Medium eignet sich speziell für die Kultivierung von Lactobazillen. Die Abkürzung MRS leitet sich von seinen Erfindern de Man, Rogosa und Sharpe ab (De Man et al., 1960). Die Zusammensetzung des Mediums ist im Folgenden dargestellt.

#### Zusammensetzung MRS-Bouillon

- 10,0 g/l Pepton
- 4,0 g/l Hefeextrakt
- 8,0 g/l Rindfleischextrakt
- 20,0 g/l Glukose
- 2,0 g/l Dikaliumphosphat
- 5,0 g/l Natriumacetat
- 2,0 g/l Amoniumcitrat
- 0,2 g/l Magnesiumsulfat
- 0,05 g/l Mangansulfat
- 1,0 g/l Tween 80 (Polysorbat 80)
- pH 5,7 ± 0,2

Natriumacetat dient als Säureregulator. Zur Förderung des bakteriellen Wachstums dienen Hefe- und Fleischextrakte sowie Peptone. Hauptbestandteile sind Peptide, Aminosäuren und Vitamine. Glukose dient als Nährstoffquelle, die sogenannte Kohlenstoff-Quelle zur Förderung des Wachstums von Bakterien. Der Emulgator Tween 80 setzt die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten herab und dient somit als Lösungsvermittler. Magnesium- und Mangansulfat stellen die Kationen für den Stoffwechsel von *L.plantarum* bereit.

Zur Herstellung von einem Liter MRS-Bouillon werden 54 g des Mediums in einem Liter destillierten Wasser gelöst und anschließend zehn Minuten bei 118 °C autoklaviert. Dabei muss besonderes Augenmerk auf eine kurze Abkühlzeit des Autoklaven gelegt werden,

da sich auf Grund der Medienbestandteile wachstumshemmende Produkte bilden können, die das Zellwachstum stark beeinträchtigen können. Die Bildung von wachstumshemmenden Produkten resultiert durch das Vorhandensein von Aminosäuren und reduzierendem Zucker, die sich unter Hitzeeinwirkung zu neuen Verbindungen umwandeln. Diese Reaktionen sind unter dem Namen Maillard-Reaktionen bekannt und wurden vom Chemiker Louis Camille Maillard 1912 entdeckt (Billaud and Adrian, 2003).

Als Testmedium für Kontaminationen wird ein LB-Medium der Firma Carl Roth verwendet. LB ist ein komplexes Nährmedium, welches zur Kultivierung von diversen Luft- und Darmbakterien verwendet wird. Zu Beginn und am Ende jeder Fermentation wird eine Probe auf LB-Nähragarplatten ausgestrichen und auf Keimfreiheit getestet.

#### Zusammensetzung LB-Agarplatten

- 5 g/l Trypton
- 10 g/l Hefeextrakt
- 5 g/l Natriumchlorid
- 20 g/l Agar-Agar

#### **3.4.1.1 Nähragarplatten**

Zur Herstellung von MRS-Nähragarplatten werden 54 g MRS-Bouillon pH 5,7 mit zwei Prozent Agar-Agar, Kobe I der Fa. Carl Roth versetzt und gemäß der Herstellerangaben in einem Liter vollentsalzten Wasser gelöst. Anschließend werden die Nähragarplatten bei 118°C zehn Minuten autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Nähragarplatten werden 20 g LB Medium eingewogen und wiederholt mit zwei Prozent Agar-Agar, Kobe I versetzt. Im Anschluss wird der Ansatz bei 121°C 15 Minuten autoklaviert.

#### **3.4.1.2 Master- und Gebrauchsnähragarplatten**

Nähragarplatten dienen der Generierung von Zellmaterial zur Inokulation von Schüttelkolbenkulturen. Für das Anlegen einer Masternähragarplatte wird eine von der DSM bezogene Kryokultur von *L.plantarum* verwendet. Unter sterilen Bedingungen werden 100  $\mu$ l der Glycerinkultur auf eine MRS-Nähragarplatte pipettiert und mit Hilfe eines sterilen Drigalskispatels gleichmäßig auf der Nähragarplatte verteilt bis die Flüssigkeit in den Agar eingezogen ist. Im Anschluss wird die Nähragarplatte in einem Inkubationsschrank der Fa. Memmert drei Tage bei 30 °C inkubiert.

#### **3.4.2 Inokulum**

Das Inokulum ist die Menge an Bakterienzellen, mit der ein Bioreaktor oder ein Schüttelkolben angeimpft wird. Für die Herstellung des Inokulums wird zunächst eine Vorkultur

hergestellt. Die Vorkulturherstellung erfolgt durch die Entnahme einer Bakterienkolonie von einer Gebrauchsnähragarplatte. Diese wird in einen 100 ml Erlenmeyerkolben, der mit 50 ml vorgewärmtem MRS-Bouillon Medium gefüllt ist, überführt. Die Dauer der Inkubation beträgt 24 Stunden. Das beimpfte Medium wird bei 30 °C im temperierbaren Schüttelwasserbad (Typ 1092, Fa. Gesellschaft für Labortechnik) bei einer Schüttelfrequenz von 150 rpm inkubiert. Zur Berechnung des benötigten Inokulumvolumens für das Animpfen des Bioreaktors und Schüttelkolbens dient die optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) des beimpften Mediums. Diese wird bei 600 nm mit einem Eppendorf Bio-Photometer nach 24 Stunden gemessen. Mit Hilfe des Wertes kann das zum Animpfen benötigte Inokulumvolumen für den Bioreaktor oder den Schüttelkolben aus

$$V_{Ino} = \frac{V_{Rea/Sch}}{\frac{OD_{600 Ino}}{OD_{600 Start Rea/Sch}}} \quad (3.1)$$

berechnet werden. Der Zeitpunkt der Zugabe des Inokulumvolumens dient als Startwert für die Kultivierung.

Hierbei sind  $V_{Rea/Sch}[l]$  das Gesamtvolumen des Hauptkultivierungsansatzes,  $OD_{600 Ino}[-]$  die optische Dichte des beimpften Mediums der Vorkultur nach 24 h und  $OD_{600 Start Rea/Sch}[-]$  die gewünschte optische Dichte beim Start der Hauptkultivierung. Für letztere wurde der Wert  $OD_{600 Start Rea/Sch} = 0,1$  gewählt.

### 3.4.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Kultivierung von *L.plantarum* im Schüttelkolben dient der Bereitstellung von Biomasse zur anschließenden Trocknung der Bakterien in der Wirbelschicht. Für die Kultivierung im Schüttelkolben werden zwei Erlenmeyerkolben mit einem Arbeitsvolumen von jeweils einem Liter verwendet. Die Vorkultur zur Bereitstellung des Inokulums für das Animpfen der mit MRS-Medium befüllten Erlenmeyerkolben wird wie im Abschnitt 3.4.2 beschrieben hergestellt. Gestartet wird die Kultivierung durch die sterile Zugabe des errechneten Inokulumvolumens in das 30 °C vorgewärmte MRS Medium. Die optische Dichte am Start beträgt  $OD_{600 Start} 0,1$ .

#### 3.4.3.1 Versuchsparameter

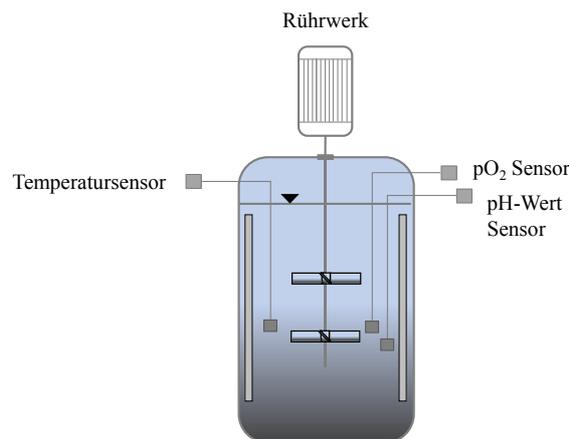
*L.plantarum* wird im MRS-Medium bei 30 °C, ohne Begasung und mit einer Schüttelfrequenz von 150 rpm mittels eines Inkubationsschüttlers (Typ 1092, Fa. Gesellschaft für Labortechnik) kultiviert. Es werden ausschließlich pH-Wert-ungeregelte Kultivierungen im Schüttelkolben durchgeführt.

### 3.4.3.2 Ernte

Die Ernte der Bakterien erfolgt in der stationären Phase nach 20 Stunden Kultivierungszeit. Dazu wird die gesamte Bakteriensuspension steril in eine zwei Liter Flasche überführt, das Medium von den Bakterien durch Zentrifugieren getrennt und zweimal mit einer einfach konzentrierten PBS-Lösung (Roti<sup>®</sup>-Stock) gewaschen. Hierfür werden jeweils 50 ml Suspension in Falcon Tubes der Fa. Grainer Bio-one überführt und die Biomasse abzentrifugiert (4700 g, 20 min, 4 °C; Hereaus<sup>®</sup>Multifuge<sup>®</sup>1L-R). Die abzentrifugierte Biomasse wird als Zellpellet bezeichnet. Im Anschluss werden die Zellpellets in zehn Milliliter PBS-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (4700 g, 20 min, 4 °C). Nach Beendigung des letzten Waschschrittes werden die Pellets in einem Milliliter PBS aufgenommen und in einer sterilen 100 ml Glasflasche zusammengeführt. Es entsteht eine 35-fach aufkonzentrierte Biomasse. Diese wird auf Eis gelegt und bis zur Trocknung am nächsten Tag maximal 15 Stunden gelagert.

### 3.4.4 Kultivierung im 2 l Bioreaktor

Die Kultivierung von *L.plantarum* in einem zwei Liter Bioreaktor wird gleichermaßen zur Erzeugung von Biomasse sowie zur Trocknung der Bakterien in der Wirbelschicht genutzt. Für die Kultivierung wird der Biostat A Plus der Fa. Sartorius mit einem Arbeitsvolumen von zwei Litern verwendet. Der Biostat A ist ein einfacher, kompakter und autoklavierbarer Rührkesselbioreaktor, der unter anderem für Forschungsanwendungen konzipiert wurde. Zur Homogenisierung und Dispergierung des Kulturmediums befinden sich im Rührkesselbioreaktor zwei 6-Blatt-Scheibenrührer, die über eine Welle mit dem Motor verbunden sind. Der verwendete Rührkesselbioreaktors ist in Abbildung 3.2 zu sehen.



**Abbildung 3.2:** Darstellung des verwendeten Rührkesselbioreaktors mit zwei Scheibenrührern

Der Motor befindet sich oberhalb des Verschlussdeckels. Da es sich bei Scheibenrührern um radial fördernde Rührer handelt, sollte der Einsatz immer mit Strombrechern verbunden sein, um eine vorherrschende Rotation der Flüssigkeit zu verhindern und eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Der verwendete Bioreaktor verfügt insgesamt über drei Strombrecher. Darüber hinaus können die Prozessparameter über eine Inline-Messung erfasst werden. Dies erfolgt durch Inline-Messsonden, die zur Messung und Regelung von pH-Wert,  $pO_2$ -Wert und Temperatur eingesetzt werden. Die Regelung der Temperatur erfolgt mit Hilfe einer Heizmanschette, die um den Bioreaktor gelegt wird. Ein Kühlstab, der sich im Inneren des Bioreaktors befindet und von kaltem Wasser durchströmt wird, ist für die Kühlung des Reaktorinhaltes verantwortlich. Die Regelung des pH-Wertes erfolgt mit Hilfe eines Pumpensystems, das je nach Bedarf Säure oder Base in den Reaktor pumpt. Der gesamte Aufbau des Biostat A Plus mit der dazugehörigen Peripherie ist in Abbildung 3.3 dargestellt.



Abbildung 3.3: Biostat A Plus Rührkesselbioreaktor der Fa. Sartorius (sartorius.com)

Die Vorkulturen zur Bereitstellung des Inokulums werden wie im Abschnitt 3.4.2 beschrieben hergestellt. Die Kultivierung wird durch die sterile Zugabe des errechneten Inokulumvolumens in das 30 °C vorgewärmte MRS-Medium gestartet. Das Anfangsvolumen des MRS-Mediums im Bioreaktor beträgt zwei Liter. Der Bioreaktor wird mit einer optischen Dichte von  $OD_{Start\ 600} = 0,1$  angeimpft.

#### 3.4.4.1 Versuchsparmeter

*L.plantarum* wird im MRS-Medium im Batch-Betrieb bei 30 °C, ohne Begasung und mit einer Rührerdrehzahl von 200 rpm fermentiert. Es werden sowohl pH-Wert geregelte als auch pH-Wert unregelte Fermentationen durchgeführt. Bei den pH-Wert geregelten Fermentationen wird der pH-Wert zunächst durch die Zugabe einer Natriumhydroxid-

Lösung mit einer Konzentration von 1 mol/l beziehungsweise einer gleich konzentrierten Salzsäure-Lösung auf einen pH-Wert in Höhe von 5,8 eingestellt. Bei pH-Wert geregelten Fermentationen von Milchsäurebakterien ist auf Grund der Bildung von Milchsäure einzig die Zugabe einer Base, in diesem Fall Natriumhydroxid (NaOH), notwendig.

#### 3.4.4.2 Ernte

Die Ernte der Bakterien erfolgte in der frühen stationären Phase nach zwölf Stunden Fermentationszeit. Dazu wird die gesamte Bakteriensuspension steril in eine zwei Liter Flasche überführt, das Medium von den Bakterien durch Zentrifugieren getrennt und zweimal mit einer einfach konzentrierten PBS-Lösung (Roti®-Stock) gewaschen. Die weiteren Bearbeitungsschritte können dem Abschnitt 3.4.3.2 entnommen werden.

#### 3.4.5 Kultivierung von *L.paracasei*

Die Kultivierung von *L.paracasei* erfolgte bei der Fa. Danisco GmbH in Niebüll und unterliegt der Geheimhaltung des Unternehmens. *L.paracasei* wird in einem MRS-ähnlichen Medium im Batch-Betrieb bei 37 °C, ohne Begasung, bei einem pH-Wert von 5,9 im Maßstab von 10 m<sup>3</sup> kultiviert. Geregelt wird der pH-Wert durch die Zugabe einer Ammoniaklösung. Genauere Angaben dazu können in dieser Arbeit nicht gemacht werden. Die Ernte der Bakterien erfolgt nach Beendigung des Basenverbrauchs in der frühen stationären Phase. Dazu wird die gesamte Bakteriensuspension ungewaschen in einen Separator überführt und dort 20-fach aufkonzentriert. Im Anschluss der Aufkonzentrierung wird das entstandene Pellet mit einem firmeninternen Standardschutzstoff versehen, eingefroren und auf Trockeneis transportiert.

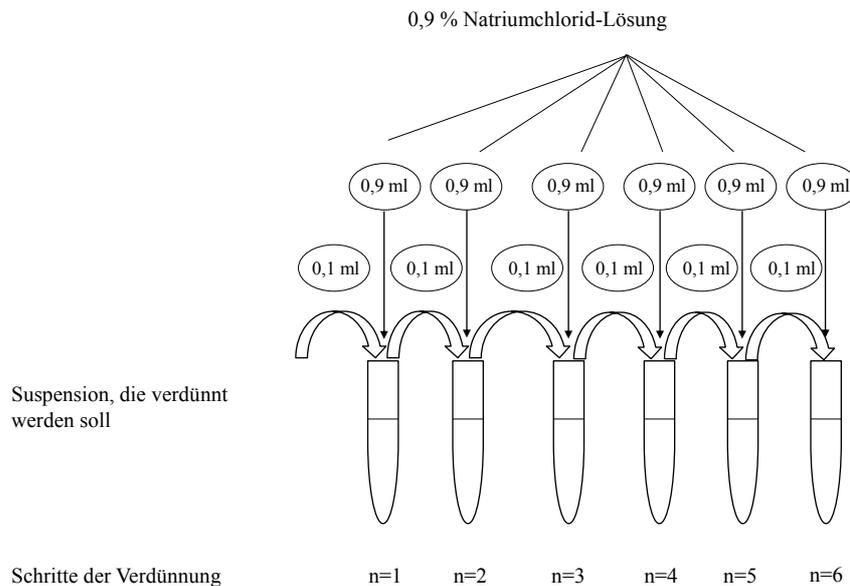
#### 3.4.6 Analytik

##### 3.4.6.1 Optische Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte ist für die Beobachtung des Wachstumsverlaufes der Bakterien während einer Kultivierung bei definierten Parametern notwendig. Aus vorher experimentell erstellten Wachstumskurven können mittels der optischen Dichte die entsprechenden Zeitpunkte für die Zellernte ermittelt werden. Als Messgerät wird das BioPhotometer plus von der Fa. Eppendorf, Hamburg, verwendet. Die Messung der optischen Dichte der Bakteriensuspension erfolgt bei einer Wellenlänge von 600 nm. Übersteigt die optische Dichte der Bakteriensuspension während der Messung den Wert 0,4, wird die Suspension mit MRS-Bouillon verdünnt.

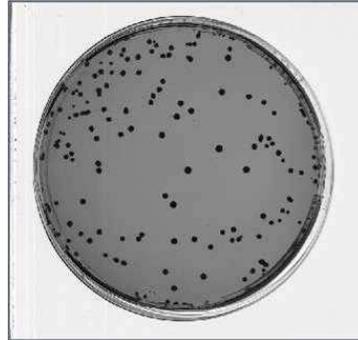
### 3.4.6.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wird mit Hilfe des Spatelplattenverfahrens bestimmt. Hierfür wird von der Bakteriensuspension eine Verdünnungsreihe mit einer 0,9 %-igen Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung) hergestellt und diese auf MRS-Agarplatten mittels Drigalskispatel ausplattiert. Für das Anfertigen einer Verdünnungsreihe werden jeweils 900  $\mu\text{l}$  der NaCl-Lösung in Eppendorf-Tubes vorgelegt und den Tubes jeweils 100  $\mu\text{l}$  Probenvolumen hinzugefügt. Veranschaulicht ist das Herstellungsverfahren von Verdünnungsreihen in der Abbildung 3.4.



**Abbildung 3.4:** Schematischer Ablauf zur Herstellung von Verdünnungsreihen aus einer Bakteriensuspension

Nach Anfertigung der Verdünnungsreihe werden jeweils 100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Bakteriensuspension auf MRS-Agarplatten pipettiert und mit einem Drigalskispatel verteilt. Im Anschluss werden die MRS-Agarplatten 72 Stunden bei 30 °C im Inkubationsschrank gelagert, bis sich Kolonien auf den Platten gebildet haben, die mit dem Auge sichtbar sind. Jede Kolonie ist aus einer einzelnen Zelle entstanden. Eine schematische Darstellung von Bakterienkolonien, die auf Agarplatten gewachsen sind, befindet sich in Abbildung 3.5.



**Abbildung 3.5:** *L. plantarum* auf einer MRS-Agarplatte nach 72 Stunden Inkubation bei 30°C

Lebendzellzahlen von Mikroorganismen werden sowohl in der Literatur als auch in der Praxis als Kolonie bildende Einheiten (KbE) angegeben. Dabei werden die auf der Platte gebildeten Kolonien  $K$  gezählt und mit dem Verdünnungsfaktor  $VF$  multipliziert. Die Berechnung der Lebendzellzahl  $N$  in [KbE/ml] erfolgt nach der Gleichung:

$$N = K \cdot VF \cdot 10 \quad (3.2)$$

mit

- $N$  [KbE/ml]: Lebendzellzahl
- $VF$  [-]: Verdünnungsfaktor.

Der zusätzliche Faktor zehn ergibt sich aus der Umrechnung der Einheiten von  $\mu l$  in  $ml$  durch die Zugabe von 100  $\mu l$  auf die Agarplatte.

#### 3.4.6.3 Biotrockenmassekonzentration

Für die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration der Milchsäurebakterien werden zunächst Reagenzgläser gewogen und jeweils die Masse der unbefüllten Reagenzgläser notiert. Nach der Kultivierung werden zehn Milliliter von der geernteten Bakteriensuspension in die vorher abgewogenen Reagenzgläsern überführt und die gesamte Bakteriensuspension bei 4700 g, 4 °C, 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran wird der Überstand verworfen und die Bakterien zwei weitere Male mit fünf Milliliter PBS gewaschen und zentrifugiert. Die Pellet enthaltenden Reagenzgläser werden mit Aluminiumfolie bedeckt und im Trockenschrank 20 Stunden bei 110 °C gelagert. Nach der Lagerung erfolgt die

Rückwaage der Reagenzgläser mit den getrockneten Pellets. Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration  $c_{BTM}$  in [g/l] ist durch Gleichung 3.3 definiert:

$$c_{BTM} = \frac{m_{Rg+Pe,tr} - m_{Rg}}{V_{Sus}} \quad (3.3)$$

- $c_{BTM}$ [g/l]: Biotrockenmassekonzentration
- $m_{Rg+Pe,tr}$ [g]: Masse Reagenzglas plus Masse des getrockneten Zellpellets
- $V_{Sus}$ [l]: Volumen der geernteten Bakteriensuspension

## 3.5 Niedertemperaturgranulierung

### 3.5.1 Versuchsreihen

Im Rahmen dieser Arbeit werden für die Herstellung wirbelschichtgetrockneter *L.plantarum* Zellen, die zudem eine hohe Lagerstabilität aufweisen sollen, unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt. In diesen sollen geeignete Prozessparameter und -größen experimentell bestimmt und festgelegt werden. Dabei haben viele Faktoren einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von *L.plantarum*. Zunächst steht im Vordergrund der Experimente, ein geeignetes Trägermaterial für die Versuche in der Wirbelschicht für *L.plantarum* zu finden. Parallel dazu werden geeignete Prozessparameter ermittelt, bei denen die Bakterien eine hohe Überlebensrate nach der Trocknung aufzeigen. Des Weiteren wird untersucht, welchen Einfluss Schutzstoffe auf die Überlebensrate und die Lagerstabilität der getrockneten Mikroorganismen haben. Nachdem die Prozessparameter und -größen zur Erzeugung eines bioaktiven Granulats mit einer hohen Lebensfähigkeit für *L.plantarum* feststehen, werden diese auf einen weiteren Bakterienstamm, *L.paracasei*, übertragen und angewandt. Zugleich werden die Überlebensraten und die Lagerstabilität von diesem Bakterienstamm untersucht. Analog zu diesen Untersuchungen finden weiterer Experimente statt, bei denen der Einfluss der Zugabe unterschiedlicher Schutzstoffmengen abermals auf die Überlebensrate und Lagerstabilität geprüft wird.

**Tabelle 3.2:** Überblick aller für die Wirbelschichttrocknung von prokaryotischen Mikroorganismen durchgeführten Versuchsreihen

Versuchsreihe	Inhalt
1	Wahl eines geeigneten Trägermaterials
2	Variation der Eindüszungszeiten
3	Untersuchung des Einflusses von Schutzstoffen
4	Übertragbarkeit ermittelter Prozessparameter auf einen anderen Bakterienstamm
5	Variation der Schutzstoffkonzentrationen

## 1. Wahl eines geeigneten Trägermaterials

Für die Niedertemperaturgranulierung von *L. plantarum* werden unterschiedliche Trägermaterialien wie Laktose (CapsuLac<sup>®</sup>60 und Tablettose<sup>®</sup>70 (Meggler)), Maltodextrin (Granadex<sup>™</sup>M 20 P (Avebe Food)) und Saccharose/Maisstärke (Zuckerpellets-Surinerts<sup>®</sup>) getestet. Von jedem Material wird je Experiment 1 kg in die Wirbelschichtanlage vorgelegt, bevor die Bakterien in die Anlage eingedüst werden. Da sich im Laufe der Experimente vor allem Maltodextrin als geeignetes Trägermaterial für die Granulierung herausstellte, wird im weiteren Verlauf der Arbeit Maltodextrin näher spezifiziert.

Die industrielle Herstellung von Maltodextrin erfolgt durch den kontrollierten enzymatischen Abbau von Stärke. Dabei werden die wasserunlöslichen langen Moleküle der Stärke zu unterschiedlich kurzen, wasserlöslichen Bruchstücken gespalten. Die Zusammensetzung von Granadex<sup>™</sup>M 20 P ist im Folgenden dargestellt. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Maltodextrin DE 20 dient die Kartoffelstärke.

### Zusammensetzung Granadex<sup>™</sup>M 20 P

- 15 mg/g Glukose
- 60 mg/g Maltose
- 90 mg/g Maltotriose
- 835 mg/g Höhere molekulare Zucker

Das Maltodextrin Granadex<sup>™</sup>M 20 P besteht aus Mono-, Di- und Polysacchariden mit variabler Kettenlänge. In Abhängigkeit vom Dextrose-Äquivalent (DE) kann die Zusammensetzung von Maltodextrinen schwanken und wird durch jene charakterisiert. Je höher das Dextrose-Äquivalent von Maltodextrin ist, desto kurzkettiger sind die Saccharide des Maltodextrins. Das Granadex<sup>™</sup>M 20 P hat laut Hersteller ein Dextrose-Äquivalent von 20 und besteht somit zu 20 % aus Glukose-Monomeren. Weitere Eigenschaften von Maltodextrin sind in Kapitel 2 erläutert.

Als weiteres Trägermaterial wird, wie anfänglich erwähnt, der Milchzucker Laktose eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein Disaccharid, welches sich aus den Molekülen D-Galaktose und D-Glukose zusammensetzt. Im Vergleich zu anderen Zuckern, wie beispielsweise Maltose, ist Laktose weniger wasserlöslich und zählt zu den reduzierenden Zuckern. Gewonnen wird sie aus der Süß- oder Sauermolke, wobei die Molke durch Erhitzen, Ultrafiltration und Ionenaustausch von den Lipiden, Proteinen und Mineralstoffen befreit wird und die Laktose daraus kristallisiert.

Zusätzlich zu Maltodextrin und Laktose findet das Gemisch Saccharose/Maisstärke, die sogenannten Zuckerpellets, Anwendung als Trägermaterial in der Wirbelschicht. Dabei handelt es sich bei dem Gemisch um 60-85 % Saccharose und 10-40 % Maisstärke.

## 2. Variation der Eindüsungszeiten

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird untersucht, welchen Einfluss die Eindüsungszeiten auf das Überleben nach der Trocknung von *L.plantarum* haben und inwieweit sich hohe Eindüsungsraten auf die Lagerfähigkeit auswirken. Dafür werden zu Beginn der Versuchsreihe Trocknungen durchgeführt, bei denen zunächst hohe Eindüsungszeiten von 180 Minuten eingestellt werden. Diese reduzieren sich im weiteren Verlauf auf 60, 40, 30 und schlussendlich auf 20 Minuten.

## 3. Untersuchung des Einflusses von Schutzstoffen

Als Schutzstoffe werden D-Sorbitol und Trehalose-Dihydrat für die Wirbelschicht-trocknung von *L.plantarum* eingesetzt. Für jedes Trocknungsexperiment wird die Bakterienmasse aus einer zwei Liter Kultivierung verwendet. Von dem jeweiligen Schutzstoff werden vor der Trocknung unabhängig von dem Gesamtvolumen der hergestellten Sprühhlösung jeweils 10 g abgewogen und der Bakteriensuspension hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten werden die mit Schutzstoff versehenen Bakterien in die Wirbelschichtanlage eingedüst.

Bei dem verwendeten Schutzstoff Trehalose handelt es sich um einen chemisch, thermisch und gegenüber Säure stabilen Zweifachzucker, der aus pflanzlicher Stärke gewonnen wird. Zudem zählt er zu den nichtreduzierenden Zuckern und zeigt als solcher keine Maillard-Reaktionen mit Aminosäuren oder Proteinen. Darüber hinaus ist Trehalose in Wasser löslich und weist eine niedrige Hygroskopizität auf.

D-Sorbit hingegen kann chemisch durch die Reduktion von D-Glukose erzeugt werden. Als Ausgangsrohstoff für die Reduktion dient dabei Stärke. D-Sorbit ist sehr gut wasserlöslich und je nach Kristallform leicht bis stark hygroskopisch.

## 4. Übertragbarkeit ermittelter Prozessparameter auf einen anderen Milchsäurebakterienstamm

Für die Überprüfung der Übertragbarkeit der für die Niedertemperaturgranulierung von *L.plantarum* bestmöglichen Prozessparameter wird ein zweiter Milchsäure produzierender Bakterienstamm, *L.paracasei*, unter Einbehaltung dieser Parameter in der Wirbelschicht getrocknet. Abermals werden die Viabilitäten nach der Trocknung untersucht und die Lagerstabilität bei Raumtemperatur und 4 °C bestimmt.

## 5. Variation der Schutzstoffkonzentration

Abadias et al. (2001) ermittelten einen Zusammenhang zwischen den Konzentratio-

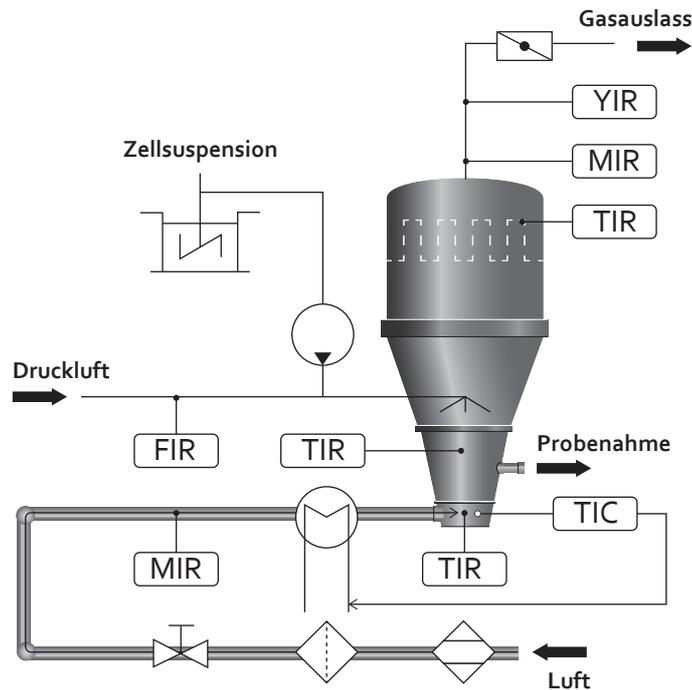
nen von Schutzstoffen und der Viabilität gefriergetrockneter Hefen. Dieser soll in einer speziellen Versuchsreihe untersucht werden. Dafür werden Experimente durchgeführt, bei denen Sorbitol in unterschiedlichen Schutzstoffmassen den *L.paracasei* Zellen vor der Trocknung hinzugegeben und die Viabilität sowie die Lagerstabilität dieser Zellen über einen Zeitraum von sechs Monaten untersucht werden. Die jeweiligen Schutzstoffkonzentrationen betragen 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 mol/l. Die Zugabemasse des Schutzstoffes wird gemäß

$$m_{prot} = c \cdot M \cdot V \quad (3.4)$$

berechnet. Hierbei steht  $m_{prot}$  [g] für die Masse des Schutzstoffes,  $c$  [mol/l] für die Schutzstoffkonzentration,  $M$  [g/mol] für die Molmasse des Schutzstoffes und  $V$  [l] für das Volumen der Bakteriensuspension.

### 3.5.2 Anlage

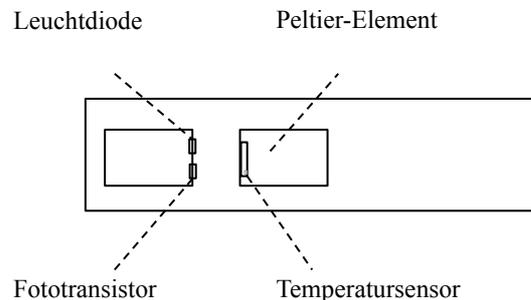
Die Granulierung und Trocknung der in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen erfolgt in der ProCell5 Laboranlage von der Firma Glatt (Weimar), die entsprechend der notwendigen Peripherie für die Trocknung von Mikroorganismen modifiziert wurde. Für die Herstellung getrockneter Mikroorganismen spielen die Reinheitsgebote eine wichtige Rolle. Ein Anforderungsmaß ist hierbei, dass es sich bei den erzeugten Produkten um eine Reinkultur handelt, in der lediglich der gewünschte Keim vorhanden ist und keine Fremdkeime aus Luft und Wasser. Demnach kommt den Sterilitätsanforderungen ein hohes Maß an Wichtigkeit zu. Damit der Eintrag der Luft in die Wirbelschichtanlage keimfrei erfolgen kann, wird zu Beginn der Versuchsreihe ein H13 HEPA Filter der Firma Kalthoff Luftfilter und Filtermedien GmbH am Lufteintritt der Anlage eingebaut. Dieser wird dazu genutzt, die in der Luft befindlichen Keime herauszufiltern. Eine zweite Methode, Fremdkeime in der Anlage abzutöten, wird durch das Aufheizen der Wirbelschichtanlage bei 121 °C realisiert. Dabei wird vor Beginn der Versuchsreihe die Temperatur der Anlage erhöht. Danach erfolgt die Abkühlung auf die gewünschte Eintrittstemperatur. Damit keine zusätzliche Feuchte durch die Luft in die Anlage eingetragen wird, passiert die Luft, bevor sie in die Anlage gelangt, einen Luftentfeuchter der Firma Munters vom Typ ML270E. Dieser entfeuchtet die Luft bis auf ein Gramm Wasser pro Kilogramm Luft. Zusätzlich wurden für eine schnelle Zugabe und Ernte der Trägermaterialien entsprechende Zugabe- und Erntebehälter an die Anlage gebaut, die vor allem für einen kontinuierlichen Betrieb geeignet sind. In Abbildung 3.6 ist ein schematisches Fließbild der modifizierten Top-Spray-Wirbelschichtanlage, bestehend aus Produktkammer, Filter, Eindüsungsvorrichtung, Luftentfeuchter und HEPA-Filter dargestellt.



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung der ProCell 5 Wirbelschicht-Laboranlage von der Fa. Glatt

Die Wirbelschichtanlage besteht aus einer konischen Produktkammer mit einem Durchmesser am Produktkammereingang von 185 mm, einem Durchmesser am Produktkammerausgang von 250 mm und einer Höhe von 335 mm. Zur schnellen Produktentnahme kann die Produktkammer ausgeschwenkt und angekippt werden. Unterhalb der Produktkammer befindet sich ein Anströmboden, der aus einer aus Edelstahl gefertigten Sintermetallplatte besteht. Die Porengröße der Sintermetallplatte beträgt 3 mm. Bei Experimenten, bei denen die Partikel der eingesetzten Materialien kleiner als 3 mm sind, wird auf die Sintermetallplatte zusätzlich ein feinmaschiges Netz gelegt. Dieses verhindert das Herabfallen der Partikel in den Bodenraum der Anlage. Innerhalb der Produktkammer befindet sich eine Zweistoffdüse der Modellreihe 970 vom Typ S4 der Fa. Schlick, die sowohl im Top-Spray als auch im Bottom-Spray-Verfahren eingesetzt werden kann. Beim Top-Spray-Verfahren ist diese 250 mm oberhalb vom Anströmboden konzentrisch angebracht. Beim Bottom-Spray-Verfahren hingegen ist sie direkt im Anströmboden eingebettet. Die Funktionsweise einer Zweistoffdüse ist durch eine Außenmischung von Gas und Sprühflüssigkeit gekennzeichnet, wobei das Gas durch Druckluft und die Sprühflüssigkeit durch eine externe Pumpe der Fa. VEB MLW Labortechnik Ilmenau Typ DP 2-2 in die Düse befördert wird. Der Gasdurchsatz wird mit einem zusätzlichen Mass Flow Meter der Fa. Bronkhorst Mättig GmbH Typ F-106BI ermittelt. An der Steuerkonsole der Wirbelschichtanlage kann der Düsenvordruck des Gases zwischen 0 und 4 bar eingestellt werden. Oberhalb der Produktkammer befindet sich der Filterraum, in dem sechs Rundfilter angebracht sind. Die Rundfilter verhindern den oberen Austrag der Partikel aus der Anlage. Außerdem kommt es in diesem Bereich

zu einer Querschnittserweiterung auf 600 mm, wodurch die Gasgeschwindigkeit verringert wird und ausgetragene Partikel der Anlage zurückgeführt werden können. In der Wirbelschichtanlage wird mit getrockneter Druckluft als Fluidisationsgas gearbeitet. Diese lässt sich für den Durchfluss am Eintritt durch ein Regelventil von 4 auf 1 bar regulieren. Der Gasvolumenstrom wird auch hier mit einem Mass Flow Meter der Fa. Bronkhorst Mättig GmbH Typ F-106BI auf der Niederdruckseite gemessen. Die Aufheizung des Fluidisierungsgases erfolgt unterhalb des Anströmbodens der Anlage durch einen Heizer. Dieser teilt sich auf drei einzeln zuschaltbare Heizelemente auf. Die Einstellung der Gaseintrittstemperatur erfolgt über die Steuerkonsole der Anlage, wobei sich der Temperatursensor direkt unterhalb des Anströmbodens befindet. Des Weiteren ist jeweils ein Temperatursensor in der Produktkammer und am Austritt der Anlage angebracht. Die Messung der Gasfeuchte erfolgt mit einem Taupunktspiegelhygrometer, das sich am Gasaustritt befindet. Für die Messung des Taupunktes wird ein temperierbarer Metallspiegel verwendet, der über ein Peltierelement abgekühlt und beheizt werden kann. Auf der Unterseite des Spiegels befindet sich ein weiterer Temperatursensor zur Messung der Spiegeltemperatur. Oberhalb des Spiegels sind Leuchtdioden angebracht, die als Lichtquelle genutzt werden. Das von dem Metallspiegel reflektierte Licht wird von Fototransistoren aufgefangen und dessen Intensität gemessen. Je nach Feuchtegehalt des in der Anlage strömenden Gases bildet sich bei einer bestimmten Temperatur Wasserkondensat auf der Spiegeloberfläche. Dadurch verringert sich die Reflektivität des Metallspiegels und die an diesem Punkt von dem Temperatursensor gemessene Spiegeltemperatur entspricht der Taupunkttemperatur.



**Abbildung 3.7:** Messprinzip zur Bestimmung der Gasfeuchte mit Hilfe eines Taupunktspiegelhygrometers

An der ProCell 5 Wirbelschichtanlage erfolgt die gesamte Erfassung der Messdaten aller verwendeten Sensoren und Messgeräte durch das PC-Messsystem Distributed I/O Systems der Firma Gautner Instrumentation. Mit diesem Messsystem können analoge Spannungssignale erfasst und in digitale Messwertsignale umgewandelt werden. Die Messdatenerfassungssoftware DASYLab11 Data Acquisition System Laboratory zeichnet die Messsignale auf und verknüpft sie rechnerisch. In einer Taktzeit von zehn Sekunden werden die Messdaten während des Prozesses gespeichert.

### 3.5.3 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung zur Niedertemperaturgranulierung von Mikroorganismen umfasst im Allgemeinen drei Arbeitsschritte:

- Anlagensterilisierung (121 °C, 15 min)
- Eindüsen der Bakteriensuspension (20 - 180 min)
- Nachtrocknen (10 min)

Bevor die geernteten Milchsäurebakterien in der Wirbelschichtanlage getrocknet werden, wird die Anlage 15 Minuten bei 121 °C sterilisiert und die Bakteriensuspension für die Trocknung vorbereitet. Die Vorbereitung umfasst die Herstellung einer Bakteriensuspension, bestehend aus Bakterien und einer einfach phosphatgepufferten Salzlösung (PBS-Lösung), das Abwiegen von 10 g des Zellschutzstoffes und die zehnmünütige Inkubation der Zellschutzstoffe mit den Bakterien. Während der Inkubation werden die Bakterien in einer Styrobox mit Kühlakkus gekühlt, um mögliche Stoffwechselfvorgänge zu unterdrücken. Nachdem die Anlage auf 40 °C abgekühlt ist und als Eintrittstemperatur 40 °C über die Steuerkonsole eingestellt wurden, werden ein Kilogramm vom jeweiligen Trägermaterial durch den Zugabezylinder, dargestellt in der Abbildung 3.8, in der Anlage vorgelegt.

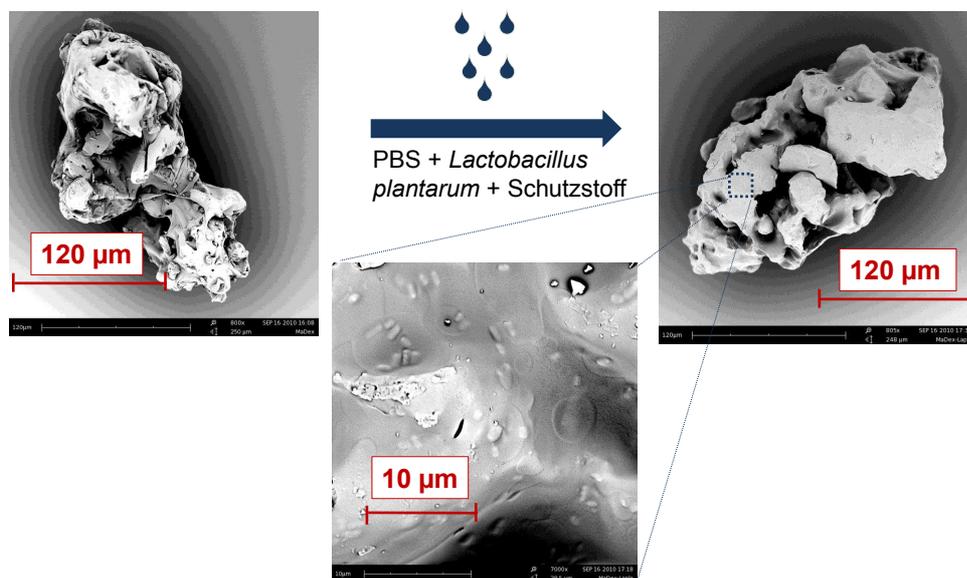


**Abbildung 3.8:** Darstellung der ProCell 5 Anlage von der Firma Glatt mit der dazugehörigen Peripherie

Anschließend erfolgt die Vortrocknung des Trägermaterials bis zum Erreichen konstanter Temperaturverläufe. Diese werden von der Datenerfassungssoftware DasyLab aufgezeichnet. Im nächsten Schritt wird die vorbereitete Sprühlösung mit Hilfe einer peristaltischen

Pumpe hinzugegeben. Die Bakteriensuspension wird mit einer Eindüsungsrate von 270 g/h auf das in der Wirbelschicht vorgelegte Trägermaterial gesprüht. Der Sprühdruk beträgt 4 bar und der Gasmassenstrom differiert in Abhängigkeit vom Trägermaterial zwischen 75 und 105 kg/h.

In der Abbildung 3.9 sind REM-Aufnahmen von einem Maltodextrin-Partikel vor und nach dem Eindüsen einer Bakteriensuspension, bestehend aus PBS, Bakterien und Schutzstoff, dargestellt. Mit Hilfe der Vergrößerung der REM-Aufnahme sind die auf dem Trägermaterial befindlichen stäbchenförmigen Bakterien erkennbar.



**Abbildung 3.9:** Darstellung eines Maltodextrin-Partikels vor und nach der Eindüsung der Bakteriensuspension in die Wirbelschichtanlage

### 3.5.4 Lagerung

Zur Lagerung der bioaktiven Granulate werden diese in sterile Glasflaschen überführt und bei Raumtemperatur sowie 4 °C geschlossen aufbewahrt. Es werden unterschiedliche Lagerungsexperimente durchgeführt, bei denen die Eindüsungzeiten, Trägermaterialien und Schutzstoffe variieren. Zudem wird untersucht, welchen Einfluss Änderungen in der Fermentation auf die Lagerfähigkeit von *L.plantarum* haben. Weiterhin erfolgt die gleiche Überprüfung anhand des Milchsäurebakterienstammes *L.paracasei*, wobei hier unterschiedliche Schutzstoffkonzentrationen von Sorbitol getestet werden. Alle Proben werden bei 4 °C und Raumtemperatur 24 Wochen gelagert.

### 3.5.5 Analytik

#### Bestimmung der Lebendzellzahl vor der Trocknung

Die Lebendzellzahl  $N_0$  [KbE/g] der nicht eingedüsten Bakteriensuspension wird in der Form

$$N_0 = \frac{N \cdot V_{Spr}}{m_{ges}} \quad (3.5)$$

berechnet. Hierbei steht  $N$  für die Lebendzellzahl der nicht eingedüsten Bakteriensuspension in [KbE/ml],  $V_{Spr}$  für das Gesamtvolumen der Sprühlösung in [ml] und  $m_{Ges}$  für die Gesamtmasse in [g] der verwendeten Einsatzmaterialien, bestehend aus Trägermaterial und gegebenenfalls einem Schutzstoff.

#### Bestimmung der Lebendzellzahl der Bakteriengranulate nach der Trocknung

Zur Beurteilung des Einflusses der Trocknung auf die Viabilität der Milchsäurebakterien werden die Lebendzellzahlen nach der Trocknung gemessen. Hierfür werden 2,5 g Granulat in 40 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung gelöst, eine Verdünnungsreihe angefertigt und jeweils drei Verdünnungen auf MRS-Agarplatten mit Hilfe eines Drigalskispatels ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden erfolgt die Bestimmung der Lebendzellzahl  $N$  durch das Auszählen der auf der Platte gebildeten Kolonien und der Anwendung der Gleichung 3.2. Dies führt zur Ermittlung der Bakterienkonzentration in KbE/ml. Wird die Granulatmasse mit einbezogen, so wird die massenbezogene Lebendzellzahl in KbE/g mit Hilfe der Gleichung

$$N_t = \frac{N \cdot V_{NaCl}}{m_{Gra}} \quad (3.6)$$

berechnet. Der Ausdruck  $N_t$  [KbE/g] steht für die Lebendzellzahl nach der Trocknung, angegeben in koloniebildenden Einheiten je g Granulat. Hingegen beschreibt  $N$  [KbE/ml] die Lebendzellzahl nach der Trocknung in koloniebildenden Einheiten je ml NaCl-Lösung.  $V_{NaCl}$  [ml] entspricht dem Gesamtvolumen der eingesetzten NaCl-Lösung (40 ml) und  $m_{Gra}$  [g] ist die in NaCl-gelöste Granulatmasse. Diese besteht aus Maltodextrin, Bakterien und gegebenenfalls einem Schutzstoff (2,5 g).

#### Bestimmung der Lebendzellzahl der Bakteriengranulate während der Lagerung

Die Herangehensweise bei der Ermittlung der Lebendzellzahl der Bakteriengranulate während der Lagerung bei 4 °C und 25 °C ist die gleiche wie zuvor beschrieben. Wiederholt werden

in regelmäßigen Zeitabständen 2,5 g Granulat in 40 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung gelöst, eine Verdünnungsreihe angefertigt und die Bakterienkonzentrationen sowohl in KbE/ml als auch in KbE/g mit Hilfe des Stapelplattenverfahrens unter Zuhilfenahme der Gleichung

$$N_l = \frac{N \cdot V_{NaCl}}{m_{Gra}} \quad (3.7)$$

bestimmt. In diesem Fall steht der Ausdruck  $N_l$  für die Lebendzellzahl nach einer bestimmten Lagerungszeit in KbE/g.

### Bestimmung der Viabilität

Aus den vorher bestimmten Lebendzellzahlen kann die Viabilität der Bakterien berechnet werden. Diese entspricht dem Quotienten aus der Lebendzellzahl vor- und nach der Trocknung. Die Angabe erfolgt in Prozent und wird mit folgender Gleichung beschrieben:

$$Via_t = \frac{N_t}{N_0} \cdot 100. \quad (3.8)$$

- $Via_t[\%]$ : Viabilität nach der Trocknung
- $N_t[KbE/g]$ : Lebendzellzahl nach der Trocknung
- $N_0[KbE/g]$ : Lebendzellzahl vor der Trocknung

### Bestimmung der Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten

Wie bereits im Kapitel 2 beschrieben, können Viabilitätsverluste der Bakterien sowohl bei der Wirbelschichttrocknung als auch während der Lagerung entstehen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen diese Verluste getrennt voneinander betrachtet und die jeweiligen Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt werden.

Die Beschreibung der Inaktivierung und die Bestimmung der Inaktivierungskonstanten während der Trocknung wird im Kapitel 4 gesondert behandelt.

Zunächst soll die Inaktivierungskinetik während der Lagerung dargelegt werden. In Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen, wie Temperatur und relativer Feuchte, können die bioaktiven Granulate nach einem bestimmten Zeitraum Viabilitätsverluste aufweisen. Diese Verluste machen sich im Rahmen dieser Arbeit durch abnehmende Lebendzellzahlen bemerkbar. Die Reaktion, mit der dieser zeitabhängige Verlust beschrieben wird, ist in folgender Gleichung dargestellt:

$$\frac{dN_l}{dt} = -k_l \cdot N_l. \quad (3.9)$$

- $N_l$ [KbE/g]: Anzahl der lebenden Zellen während der Lagerung
- $k_l$ [1/Tage]: Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung während der Lagerung

Durch das Lösen der Gleichung 3.9 ergibt sich:

$$\ln \frac{N_l}{N_t} = -k_l \cdot (t_l - t_t). \quad (3.10)$$

Die Gleichung 3.10 beschreibt die zeitliche Änderung der Lebendzellzahl  $N_l$  nach einem bestimmten Lagerungszeitraum bezogen auf die ermittelte Lebendzellzahl  $N_t$  nach der Trocknung. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_l$  steht somit für die Inaktivierungsgeschwindigkeit während der Lagerung.

### Bestimmung des Restwassergehaltes

Die Bestimmung des Restwassergehaltes der Bakteriengranulate erfolgt durch die volumetrische Karl-Fischer-Titration. Dafür wird das Gerät der Fa. Metrohm, bestehend aus einem 907 KF Titrando und einem 860 KF Thermoprep, unter Zuhilfenahme der Software tiamo 2.1, verwendet. Es werden jeweils 0,2 g Hydranal-Water-Standard und 0,1 g Bakteriengranulat in Vials eingewogen und mit einem Septum verschlossen. Für die Blindwertmessung werden drei mit Septen verschlossene, leere Vials verwendet. Nach drei Messungen bei 140 °C und einem Gasfluss des Aufheizofens von 148 ml/min berechnet die Software den Mittelwert und verwendet diesen für weitere Analysen. Sind Fehlmesungen oder starke Streuungen zu erkennen, wird die begonnene Messreihe beendet und wiederholt. Zusätzlich wird zu Beginn und zum Ende jeder Messreihe eine Doppelbestimmung des Wasserstandards durchgeführt, um das Gerät auf Dichtigkeit und Funktionalität zu überprüfen. Die Doppelbestimmung des Wasserstandards erfolgt bei 150 °C und 148 ml/min. Der Restwassergehalt der Bakteriengranulate wird bei 140 °C und 148 ml/min bestimmt. Von jeder Probe wird eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Bei starken Abweichungen (0,3%) werden die Messungen wiederholt. Der Restwassergehalt der Bakteriengranulate wird direkt nach der Granulierung und am Ende der Lagerungszeit bestimmt.

### Bestimmung der Wasseraktivität

Der Wasseraktivitätswert ( $a_w$ -Wert) ist die relative Feuchte, die in der umgebenden Atmosphäre herrschen muss, damit kein Wasseraustausch zwischen Material und Luft stattfindet. Die Wasseraktivität der Bakteriengranulate wird mit dem AquaLab Modell CX-3TE der Firma IUL Instruments gemessen. Um die Messkammer des AquaLabs zu trocknen, wird zuerst eine Messung mit Aktivkohle (Fa. IUL Instruments) durchgeführt. Im Anschluss erfolgt die Messung des  $a_w$ -Wertes von einer Standardlösung. Der  $a_w$ -Wert der Standardlösung sollte  $0,250 \pm 0,003$  betragen. Danach erfolgt die Messung der Probe. Die Bestimmung des  $a_w$ -Wertes der Bakteriengranulate findet unmittelbar nach der Wirbelschichttrocknung und nach Beendigung der Lagerungsexperimente statt.

### Einstellung bestimmter Wasseraktivität

Die Einstellung einer bestimmten Wasseraktivität in den Bakteriengranulaten erfolgt im Anschluss an die Granulierung. Dafür wird zunächst der Bodenraum in einem Exsikkator mit einer gesättigten Salzlösung bedeckt. Oberhalb dieser Lösung befindet sich eine Keramikplatte, die dafür sorgt, dass die im Exsikkator gelagerten Proben nicht in Kontakt mit der Salzlösung kommen. Als Proben werden jeweils ein Gramm von dem hergestellten Bakteriengranulat verwendet. Diese werden in einem nicht geschlossenen Vial bei  $4\text{ °C}$  auf der Keramikplatte in dem Exsikkator gelagert. Die Lagerung der Bakteriengranulate im Exsikkator wird dann beendet, wenn sich ein Gleichgewicht zwischen der Probe und der Umgebung eingestellt hat und die gravimetrische Massenzunahme der Probe kleiner als ein Prozent ist. Als Salz zum Einstellen der Wasseraktivität wird Kaliumacetat  $CH_3COOK$  verwendet. Der  $a_w$ -Wert beträgt 0,23. Dieser Wert liegt in unmittelbarer Nähe zu dem  $a_w$ -Wert nach der Wirbelschichttrocknung ( $a_w$ -Wert = 0,2). Dadurch ist zu erwarten, dass sich das Feuchtgleichgewicht zwischen der Probe und der Umgebung schneller einstellt und sich demnach die Wartezeit verkürzt. Die hergestellten Proben finden im Anschluss für die Ermittlung der Inaktivierungskinetik von *L.plantarum* während der Trocknung Verwendung.

### Bestimmung der Sorptionsisothermen

Die Aufnahme von Sorptionsisothermen erfolgt mit dem Messgerät Q 5000 der Firma Porotec. Das Messgerät nimmt den Wassergehalt einer Probe bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten beziehungsweise relativen Feuchten auf. Dieser Wassergehalt wird gravimetrisch ermittelt und bei der späteren Auswertung auf die Trockensubstanz bei 0 % relativer Feuchte bezogen. Bestimmt werden die Adsorptions- und Desorptionsisothermen bei  $5\text{ °C}$  und bei Raumtemperatur  $25\text{ °C}$ . Je Feuchteschritt dauert die Messung mindestens 30 und maximal 1000 Minuten. Das Gleichgewicht ist dann erreicht, wenn die Gewichtsänderung über eine Dauer von zehn Minuten kleiner als 0,002 % ist. Als Anfangsfeuchte wird 0 % und als Endfeuchte 80 % gewählt. Die Feuchteschritte betragen 10 %. Aufgenommen werden die Sorptionsisothermen von dem Gemisch aus Maltodextrin und *L.plantarum* sowie von dem Dreifachgemisch aus Maltodextrin, *L.plantarum* und dem jeweiligen Schutzstoff Trehalose beziehungsweise Sorbitol.

### 3.6 Statistik

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Experimenten durchgeführt. Daher liegt das Augenmerk auf der kritischen Betrachtung der Fehler, welche sich in Folge der einzelnen Herstellungsschritte, vom Mikroorganismus zum Granulat, ergeben. Große Fehler entstehen durch das zur Bestimmung der Lebendzellzahlen angewandte Stapelplattenverfahren. Dieses wird sowohl während als auch nach der Fermentation, vor und nach der Trocknung sowie während der Lagerung verwendet. Bei jedem Herstellungsschritt erfolgt die Ermittlung der Lebendzellzahlen durch eine Dreifachbestimmung. Die jeweiligen Wassergehalte und die Wasseraktivitäten der bioaktiven Granulate am Ende der Trocknung und nach Beendigung der Lagerzeit liegen in Doppelbestimmung vor. Im Falle der Granulierungsexperimente, die im Ergebnisteil mit  $n = 3$  gekennzeichnet sind, handelt es sich um drei unabhängig voneinander durchgeführte Granulierungen.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Fehleranalyse geht mit der Bildung des arithmetischen Mittelwertes  $\bar{Z}$  der einzelnen Größen, wie Lebendzellzahl, Wassergehalt und -aktivität einher. Dieser berechnet sich in Anbetracht eines Stichprobenumfanges von  $n$  mit der Gleichung

$$\bar{Z} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Z_i. \quad (3.11)$$

Die Ermittlung der Messunsicherheit vom arithmetischen Mittel erfolgt durch die Berechnung der empirischen Standardabweichung nach der Gleichung

$$S_{\bar{Z}} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2}. \quad (3.12)$$

Diese beschreibt die Streuung der Messwerte um den Mittelwert. In den folgenden Kapiteln werden diese Unsicherheiten der Messfehler in der Form angegeben:

$$Z = \bar{Z} \pm \Delta \bar{Z}. \quad (3.13)$$

Bei dieser Angabe steht  $\Delta\bar{Z}$  für die Standardabweichung in Beziehung zum Vertrauensbereich. In Abhängigkeit von der Anzahl der Stichproben leitet sich der Vertrauensbereich ab und es kann der gewünschte Bereich für die Berechnung der Messfehler gewählt werden. Der Vertrauensbereich wird mit dem Faktor  $\tau$  ausgedrückt. Die Gesamtheit der Messunsicherheiten wird als Produkt aus dem Faktor  $\tau$  und der Messunsicherheit vom arithmetischen Mittel gemäß

$$\Delta\bar{Z} = \tau\bar{S}_Z \quad (3.14)$$

berechnet. Mit Hilfe der Tabelle 3.3 kann der Faktor  $\tau$  ermittelt werden.

**Tabelle 3.3:** Faktor  $\tau$  in Abhängigkeit von der Stichprobenanzahl und dem Vertrauensbereich

n	$\tau_{68,27\%}$	$\tau_{95\%}$	$\tau_{99\%}$
3	1,3	4,3	19,2
5	1,1	2,8	6,6
10	1,1	2,3	4,1
20	1,0	2,1	3,4
$\infty$	1,0	2,0	3,0

Ausgehend von einem Vertrauensbereich von 68,27 % ergibt sich bei der Anzahl von  $n = 3$  ein  $\tau$  von 1,3. Im Rahmen dieser Arbeit wird dieser Wert bei der Angabe der Messunsicherheit bei der Darstellung der Ergebnisse mit berücksichtigt.

## Kapitel 4

# Modellierung und Bilanzierung

Im Laufe der letzten Jahre beschäftigte sich eine Vielzahl von Wissenschaftlern mit der mathematischen Modellierung der Inaktivierungskinetik von Biomolekülen und Mikroorganismen während der Trocknung. Dabei wurde vorrangig das Augenmerk auf die Inaktivierungskinetik von Enzymen (Yamamoto and Sano, 1992), (Meerdink and Riet, 1995) und eukaryotischen Mikroorganismen (Alpas et al., 1996), (Debaste et al., 2008) gelegt. Mit der Arbeit von Zimmermann (1987) konnte zum ersten Mal die Inaktivierung von Enzymen der *Saccharomyces cerevisiae* während der Wirbelschichttrocknung mit einem mathematischen Modell beschrieben werden. Der Versuch von Zimmermann (1987), dieses mathematische Modell auf die Sprühtrocknung von prokaryotischen Mikroorganismen zu übertragen, scheiterte. Der Grund dafür lag in der fehlenden Messtechnik, wodurch die Partikelfeuchte und -temperatur in der Wirbelschicht nicht ermittelt werden konnten. Aufbauend auf den Erkenntnissen von Zimmermann (1987) gelang es Lievens (1991) ein Modell zur Beschreibung der Inaktivierungskinetik von *L.plantarum* während der Wirbelschichttrocknung zu entwickeln. Dies erfasst sowohl die thermische als auch die durch den Wasserentzug hervorgerufene Inaktivierung. Dafür stellte er ein Gemisch aus Kartoffelstärke und Bakterien her, formte zylindrische Partikel und trocknete diese in der Wirbelschicht. Das Trocknungsmodell von Lievens (1991) basiert auf die *Short-Cut* Theorie von Liou (1982) und der Wärmebilanz von dem getrockneten Material. Mit Hilfe des Modells kann der Wassergehalt und die Feuchteverteilung innerhalb der Partikel sowie die Temperatur dieser während der Wirbelschichttrocknung berechnet werden. In der *Short-Cut* Theorie stellt die Trocknungseffizienz  $E$  eine wichtige Größe dar. Diese wird mit der Gleichung

$$E = \frac{X_0 - \bar{X}}{X_0 - X_e} \quad (4.1)$$

beschrieben. Dabei stehen  $X_0$  für den Anfangswassergehalt,  $\bar{X}$  für den mittleren Wassergehalt der Partikel und  $X_e$  für den Endwassergehalt nach einer bestimmten Trocknungszeit. Da die Trocknungseffizienz den Trocknungsprozess in Abhängigkeit von der Zeit beschreibt, wird dieser Parameter in dem Modell von Lievens (1991) als Zeitparameter genutzt. Die Vorausberechnung der Feuchteverteilung innerhalb der Partikel erfolgt nume-

risch, wobei vom Wassergehalt der Mittelwert implementiert wurde. Bei der Kalkulation der Produkttemperatur wird von einem einheitlichen Temperaturprofil ausgegangen. In Anbetracht des Einflusses der Trocknung auf die Zellinaktivierung wird aus der Gleichung

$$\left(\frac{dA}{dt}\right)_{tot} = \left(\frac{dA}{dt}\right)_{therm} + \left(\frac{dA}{dt}\right)_{dehydr} \quad (4.2)$$

die Gleichung

$$\left(\frac{dA}{dE}\right)_{tot} = \left(\frac{dA}{dE}\right)_{therm} + \left(\frac{dA}{dE}\right)_{dehydr} \quad (4.3)$$

abgeleitet. Dabei wird die thermische Inaktivierung als Reaktion erster Ordnung angenommen und die Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante damit bestimmt. Im Gegensatz dazu ermittelt Lievens (1991) die Inaktivierungskonstante, hervorgerufen durch die Dehydrierung, mit Hilfe von Anpassungen an Messdaten durch frei gewählte Gleichungen bei einer Trocknungstemperatur von 30 °C.

Bis heute wird auf die Ansätze in diesem Modell zurückgegriffen. In diesem Zusammenhang wird auf Chen and Patel (2007) verwiesen, die ebenfalls die Inaktivierungskinetik von Mikroorganismen und Enzymen während einer Trocknung beschreiben. Chen and Patel (2007) beschäftigten sich mit der Inaktivierungskinetik von Mikroorganismen während einer Tröpfchentrocknung. Dabei entfernten sie sich von den üblichen, zur Vereinfachung genutzten Modellannahmen, bei denen die Feuchtegradienten und -temperaturen innerhalb der Partikel ungeachtet blieben. Im Gegenzug dazu untersuchten sie, ob die Abhängigkeit der Feuchteverteilung innerhalb der Partikel mit Hilfe der Trocknungsrate erfasst werden kann und sich dadurch die Simulationsergebnisse verbessern. Im Rahmen der Untersuchungen von Chen and Patel (2007) ergab sich, dass durch die Berücksichtigung der Trocknungsrate  $dX/dt$  die Feuchtegradienten der Partikel mit einbezogen werden und dadurch die Simulationsdaten weitaus besser mit den experimentellen Daten übereinstimmen.

In Anlehnung an die Berücksichtigung der Trocknungsrate  $dX/dt$  wird in der hier vorliegenden Arbeit zur Erstellung eines Inaktivierungsmodells für die Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum* unter Einsatz von Trägermaterialien zunächst ein Wirbelschichttrocknungsmodell entwickelt, in dem sowohl die Trocknungsrate  $dX/dt$  als auch der Temperaturverlauf in der Wirbelschicht  $dT/dt$  erfasst werden. Die durch das Wirbelschichttrocknungsmodell ermittelten Werte für  $dX/dt$  und  $dT/dt$  sind essentiell für das sich anschließende Inaktivierungsmodell. Zunächst erfolgt die Beschreibung des diskontinuierlichen Wirbelschichttrocknungsprozesses in Form von Massen- und Energiebilanzen. Ausgehend von diesen Bilanzen werden die Verläufe der Temperatur und Wassergehalte während der Trocknung erfasst. Im Folgenden werden die zur Beschreibung des Modells notwendigen Bilanzierungsansätze genannt und erläutert.

## 4.1 Wirbelschichttrocknungsmodell

Der durch die Granulierung beziehungsweise Trocknung verursachte Wasserverlust im Material erfolgt durch Verdunstung. Dadurch verringert sich die Masse des Materials. Dieser Massenverlust wird in dem Modell mit Hilfe der *Massenbilanz des Produktes* beschrieben. Im selben Maße wird die Aufnahme des aus dem Material verdunsteten Wassers in der Luft durch die *Massenbilanz der Luft* wiedergegeben. Infolge des verdunsteten Wassers aus dem Material ändert sich ebenfalls die Produktfeuchte und damit verbunden die Produktenthalpie. Diese Änderung wird in der *energetischen Bilanzierung des Produktes* berücksichtigt. Ein Grund für die Enthalpieänderung des Produktes ist die Wärmeübertragung von der höher temperierten Luft an das Material und die verdunstete Wassermenge. Der dadurch entstehende Energieaustausch mit der Luft wird mit Hilfe der *energetischen Bilanzierung der Luft* dargelegt. Des Weiteren findet ein Energieaustausch zwischen der Apparatewand und dem Material beziehungsweise der Luft statt. Dieser kann sowohl bei isolierten als auch bei nicht isolierten Wirbelschichten zu signifikanten Wärmeverlusten führen und ist daher stets abhängig von der Umgebungstemperatur. Dieser Energieaustausch wird mittels der *energetischen Bilanzierung der Wand* charakterisiert. Somit werden in dem aufgestellten Modell die fünf Zustandsgrößen Produktfeuchte, -temperatur, Luftfeuchte, -temperatur und Wandtemperatur betrachtet und miteinander verbunden.

In der Literatur sind bereits Modelle zur Beschreibung der Trocknung in Wirbelschichten zu finden. Dabei wird auf das Modell von Burgschweiger (2000) hingewiesen. In diesem wandelt Burgschweiger (2000) das Konzept der normierten Trocknungskurve von Van Meel (1958) ab, wodurch dieses auch bei hygroskopischen Materialien Anwendung findet. Obendrein beschäftigte sich Peglow (2005) mit der Modellbildung eigenschaftsverteilter Systeme bei Wirbelschichtagglomerationen und koppelte die Populationsbilanzen mit stofflichen und energetischen Bilanzierungen des Materials, der Luft und der Apparatewand. Dabei orientierte er sich stark an dem Modell von Burgschweiger (2000) und entwickelte ein Modell, das erfolgreich das instationäre Verhalten bei der Agglomeration einschließlich der Nachtrocknung beschreibt. Ihlow (2006) nutzte ebenfalls die oben genannten Erkenntnisse von Burgschweiger (2000) und leitete ein Modell ab, mit dem ein Wirbelschichtgefrieretrocknungsprozess von biologischen Materialien simuliert werden kann. In Anlehnung an dem Modell von Ihlow (2006) soll in dieser Arbeit dieses abgewandelt und auf die Wirbelschichttrocknung von prokaryotischen Mikroorganismen übertragen werden. Im Anschluss daran soll das modifizierte Wirbelschichttrocknungsmodell mit einem Inaktivierungsmodell gekoppelt werden, welches die Inaktivierung der Bakterien während der Trocknung erfasst.

### 4.1.1 Modellannahmen

Für die Erstellung der Bilanzgleichungen werden die relevanten Modellannahmen zur Beschreibung der Material- und Luftbewegung aufgezählt. Zunächst wird bei der Partikelbewegung in der Wirbelschicht von einem idealen Rührkessel ausgegangen, bei dem die Partikel gut durchmischt sind. Darüber hinaus wird eine ideale Pfropfenströmung der Luft vorausgesetzt. Als weitere Prämissen sind die zu vernachlässigenden Temperaturgradien-

ten innerhalb der Partikel zu nennen. Im Falle der Temperatur treffen diese idealisiert bei Biot-Zahlen kleiner als eins zu. Zusätzlich wird bei der Modells substanz Maltodextrin von einer Kugelform ausgegangen, welche monodispers verteilt ist. Außerdem wird die Wandtemperatur als ortsunabhängig angenommen.

#### 4.1.2 Bilanzierung

Die Bilanzierung wird an einem beliebigen Höhenelement der Wirbelschicht, dargestellt in Abbildung 4.1, vorgenommen. Darin sind alle relevanten Energieströme eingezeichnet. Zuerst liegt das Augenmerk auf der Erstellung der Massenbilanz für das Produkt.

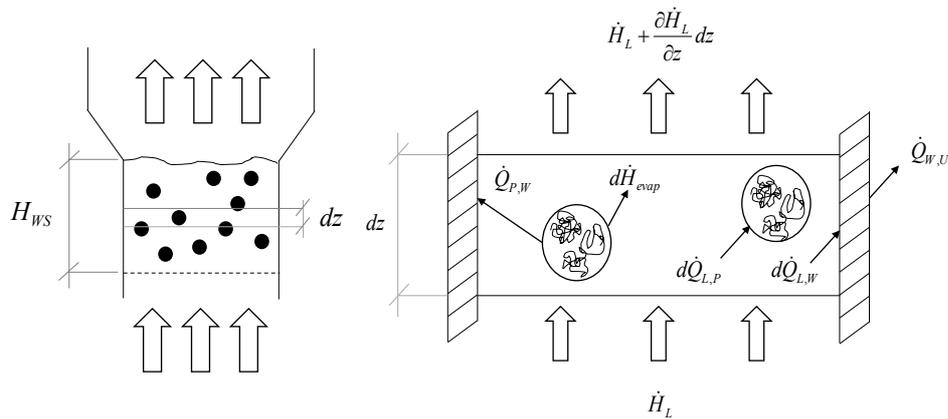


Abbildung 4.1: Darstellung des Wirbelschichttrocknungsmodells

#### Massenbilanz des Produktes

Für die Berechnung der Menge des verdunsteten Wassers aus dem Material sowie von dem durch die Luft aufgenommenen werden Massenbilanzen aufgestellt. In der Massenbilanz des Materials liegt der Fokus auf der Veränderung des Wassergehaltes in Bezug zur Zeit. Diese Veränderung wird durch

$$\frac{dm_p}{dt} = -\dot{M}_{evap} \quad (4.4)$$

ausgedrückt. Aus Gleichung 4.4 geht hervor, dass sich die Masse des Materials durch die Verdunstung des Wassers über die Zeit verändert. Dabei wird die Wassermasse gemäß

$$m_w = m_{tr,p} \cdot X \quad (4.5)$$

berechnet. Werden die Gleichungen 4.4 und 4.5 gekoppelt, ergibt sich die zeitliche Änderung des Wassergehaltes im Material zu

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{\dot{M}_{evap}}{m_{tr,p}}. \quad (4.6)$$

#### *Massenbilanz der Luft*

Die vom Material abgegebene Wassermasse wird von dem Gasmassenstrom der Luft aufgenommen. Folglich hängt der Beladungszustand der Luft direkt vom Feuchtegehalt des Produktes ab. In der gaseitigen Massenbilanz wird zum Einen die trockene Luft und zum Anderen der Wasserdampf berücksichtigt. Dabei ist die Massenänderung abhängig vom Ort und der Zeit. Für ein beliebiges differentielles Volumenelement gilt

$$\frac{\partial m_L}{\partial t} = -\frac{\partial \dot{M}_L}{\partial z} dz + d\dot{M}_{evap}. \quad (4.7)$$

Wie eingehend erläutert, wird die Gasmasse durch die Summe der trockenen Luft und des Wasserdampfes wie folgt

$$m_L = m_{tr,L}(1 + Y) \quad (4.8)$$

beschrieben. Die zeitliche Änderung der Luftbeladung im differentiellen Volumenelement wird durch

$$\frac{\partial Y}{\partial t} = -\frac{\dot{M}_{tr,L}}{m_{tr,L}} \frac{\partial Y}{\partial z} dz + \frac{d\dot{M}_{evap}}{dm_{tr,L}} \quad (4.9)$$

erfasst.

#### *Energiebilanz des Produktes*

Die Enthalpieänderung des Produktes über die Zeit wird mit Hilfe von Wärme- und Enthalpieströmen beschrieben. Dabei geht einerseits der Wärmestrom zwischen der Luft und dem Produkt sowie zwischen dem Produkt und der Wand in die Differentialgleichung ein. Andererseits findet der Enthalpiestrom des verdunsteten Wassers Berücksichtigung. Zusammenfassend wird die Enthalpieänderung im Produkt durch

$$\frac{dH_P}{dt} = \dot{Q}_{L,P} - \dot{Q}_{P,W} - \dot{H}_{evap} \quad (4.10)$$

charakterisiert. Die Enthalpie des Produktes berechnet sich gemäß:

$$H_P = m_{tr,P}(c_{tr,P} + c_{wl}X)\vartheta_P. \quad (4.11)$$

Die Verknüpfung der zwei vorangegangenen Gleichungen mit einem Ausdruck für den Enthalpiestrom der Verdunstung sowie mit kinetischen Ansätzen für die Wärmeströme führt zur zeitlichen Änderung der Produkttemperatur, die als

$$\begin{aligned} \frac{d\vartheta_P}{dt} = \frac{1}{m_{tr,P}(c_{tr,P} + c_{wl}X)} & [\alpha_{L,P}A_P(\bar{\vartheta}_L - \vartheta_P) - \alpha_{P,W}A_W(\vartheta_P - \vartheta_W) \\ & - \dot{M}_{evap}(c_{P,D}\bar{\vartheta}_L + \Delta h_{evap,0}) - m_{tr,P}(c_{wl}\vartheta_P)\frac{dX}{dt}] \end{aligned} \quad (4.12)$$

ausgedrückt werden kann. Auf Grund der vorangestellten Annahme, dass es sich bei dem Modell um einen idealen Rührkessel mit idealer Rückvermischung der Partikel handelt, ist deren Temperatur  $\vartheta_P$  innerhalb der Wirbelschicht einheitlich. Hingegen ist die Lufttemperatur örtlich veränderlich, so dass sie zur Nutzung in Gleichung 4.12 über die Höhe der Wirbelschicht

$$\bar{\vartheta}_L = \frac{1}{H_{WS}} \int_0^{H_{WS}} \vartheta_L dz \quad (4.13)$$

gemittelt werden muss.

#### *Energiebilanz der Luft*

In Abhängigkeit von dem Ort und der Zeit ändert sich der energetische Zustand der Luft infolge von Wärmeübertragung an das Produkt sowie an die Apparatewand und dem Enthalpiestrom des vom Produkt verdunsteten Wassers. Die Änderung des energetischen Zustandes wird mit

$$\frac{\partial H_L}{\partial t} = \frac{\partial \dot{H}_L}{\partial z} dz - d\dot{Q}_{L,P} - d\dot{Q}_{L,W} + d\dot{H}_{evap} \quad (4.14)$$

berechnet. Die Enthalpie der Luft wird mit der Gleichung

$$H_L = m_{tr,L}(c_{P,L}\vartheta_L + c_{P,D}Y\vartheta_L + Y\Delta h_{evap,0}) \quad (4.15)$$

ausgedrückt. Die Zusammenfassung der Gleichungen 4.14 und 4.15 führt zur Energiebilanz der Luft:

$$\frac{\partial \vartheta_L}{\partial t} = -\frac{\partial \vartheta_L}{\partial z} dz - \frac{1}{dm_{tr,L}(c_{P,L} + c_{P,D}Y)} [\alpha_{L,P} A_P (\bar{\vartheta}_L - \vartheta_P) + \alpha_{L,W} A_W (\vartheta_L - \vartheta_W)] \frac{dz}{H_{WS}} \quad (4.16)$$

### Energiebilanz der Wand

Innerhalb der Wirbelschicht werden Wärmeströme vom Produkt und der Luft an die Wand übertragen. Im Gegenzug gibt die Wand in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur Wärme an die Umgebung ab. Aus diesen Gründen besteht die Notwendigkeit, dass die Energiebilanz der Wand in dem Modell ebenfalls Berücksichtigung findet. Die Enthalpieänderung der Wand wird mit

$$\frac{dH_W}{dt} = \dot{Q}_{L,W} + \dot{Q}_{P,W} - \dot{Q}_{W,U} \quad (4.17)$$

berechnet. Dabei wird die Änderung der Wandtemperatur über die Zeit mit der Differentialgleichung

$$\frac{d\vartheta_W}{dt} = \frac{1}{m_W c_W} (\alpha_{L,W} A_W (\bar{\vartheta}_L - \vartheta_W) + \alpha_{P,W} A_W (\vartheta_P - \vartheta_W) - \alpha_{W,U} A_W (\vartheta_W - \vartheta_U)) \quad (4.18)$$

erfasst.

### 4.1.3 Kinetiken

Die Zusammenhänge zwischen den Wärme- und Stoffübergangsvorgängen sowie deren beeinflussende Größen werden bei der Erstellung von Bilanzgleichungen durch Kinetiken erfasst. Dabei wird zwischen der Wärme- und Stoffübergangskinetik unterschieden.

Wie bereits aus den Bilanzgleichungen hervorgeht, finden Wärmeübergänge zwischen Luft und Produkt, Luft und Wand, Produkt und Partikel sowie der Wand und Umgebung statt. Diese Übergänge werden in den Bilanzgleichungen durch Ausdrücke des Typs

$$\dot{Q} = \alpha A \Delta \vartheta \quad (4.19)$$

dargestellt. Die Berechnung der dazu notwendigen Wärmeübergangskoeffizienten erfolgt durch validierte Korrelationen aus der Literatur. Diese sind im Anhang dieser Arbeit dargelegt.

Die Stoffübergangskinetiken werden in Anlehnung an das Modell von Burgschweiger (2000) aufgestellt. Dieser berechnet den ins Gas verdunstenden Wassermassestrom für den ersten Trocknungsabschnitt mit Hilfe der bereits im Kapitel 2 vorgestellten Gleichung

$$\dot{m}_{evap,I} = \rho_{tr.L}\beta_{L,P}A_P(Y_{Gl}(\vartheta_P, X) - Y). \quad (4.20)$$

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 erläutert, arbeitete Burgschweiger (2000) mit der normierten Trocknungskurve eines Einzelpartikels. Mit Hilfe dieser Trocknungskurve konnte er die inneren Widerstände im zweiten Trocknungsabschnitt erfassen. Unter Berücksichtigung dieser modifizierte er Gleichung 4.20 zu:

$$\dot{m}_{evap} = \rho_{tr.L}\beta_{L,P}A_P(Y_{Gl}(\vartheta_P, X) - Y)\dot{\nu}(\eta). \quad (4.21)$$

## 4.2 Inaktivierungsmodell

Die Entwicklung eines Modells zur Beschreibung der Inaktivierungskinetik von Mikroorganismen während eines Trocknungsprozesses ist ein wichtiges Instrument zur Simulation der Trocknung im industriellen Maßstab. Die Kopplung von Trocknungs- und Inaktivierungsmodellen bietet dabei zahlreiche Vorteile. Beispielsweise können gewünschte Produkteigenschaften direkt durch den Granulationsprozess gesteuert werden. Dies führt zu einer verbesserten Qualität des Produktes. Zu den gewünschten Produkteigenschaften sollen außerdem hohe Aktivitäten und Überlebensraten der Mikroorganismen nach dem Trocknungsprozess erreicht werden. Dies gelingt durch die zusammenhängende Betrachtung des Trocknungs- und Inaktivierungsprozesses. In dem folgenden Modell sollen diese korrelierenden Größen, die sich aus der Trocknung ergeben, aufgegriffen werden, um mit deren Hilfe die Inaktivierungskinetik von *L.plantarum* zu beschreiben.

### 4.2.1 Modellannahmen

Für das Erstellen des Inaktivierungsmodells für *L.plantarum* wird zunächst auf die Modellannahmen aus Kapitel 4.1.1 verwiesen. Zusätzlich zu diesen Annahmen beschränkt sich im Inaktivierungsmodell die Beschreibung der Viabilitätsverluste auf den Nachtrocknungsprozess. Auf Grundlage von experimentellen Untersuchungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte festgestellt werden, dass sich mit kleiner werdenden Eindüsungszeiten die Überlebensrate von *L.plantarum* deutlich steigert. In Anbetracht dieser Tatsache wird das gekoppelte Wirbelschichttrocknungs- und Inaktivierungsmodell ausschließlich bei den Versuchen angewandt, bei denen eine kurze Eindüsungszeit von 20 Minuten gewählt wurde. Dadurch wird angenommen, dass während des EindüSENS beziehungsweise des Granulationsschrittes keine Viabilitätsverluste auftreten und einzig in der Nachtrocknungszeit von zehn Minuten Zellschäden zustande kommen.

## 4.2.2 Kinetiken

Wie eingangs erwähnt, führen während der Trocknung sowohl die thermische Exposition als auch die Dehydrierung zur Inaktivierung der Mikroorganismen. Aus diesem Grund setzt sich die Gleichung zur Beschreibung der Inaktivierung aus zwei Termen, einen für die thermische Inaktivierung und einen für die Inaktivierung durch Dehydrierung zusammen:

$$\left(\frac{dN}{dt}\right)_{tot} = \left(\frac{dN}{dt}\right)_{therm} + \left(\frac{dN}{dt}\right)_{dehydr}. \quad (4.22)$$

Die Bezeichnung  $N$  bezieht sich auf die Anzahl der lebenden Zellen, welche sich in Folge der Trocknung ändert. Diese Änderung der lebenden Zellen zum Ausgangszustand ( $t = 0$  min) wird im Folgenden mit  $A$  angegeben:

$$A = \frac{N}{N_0}. \quad (4.23)$$

Mit Hilfe der Inaktivierungskinetik wird der Zusammenhang zwischen der Temperatur in der Gasphase, Partikelfeuchte sowie Trocknungszeit auf die Überlebensrate von *L.plantarum* beschrieben. Dabei erfolgt die Ermittlung des zeitlichen Temperaturverlaufes während der Trocknung aus der Energiebilanz des Wirbelschichttrocknungsmodells. In gleicher Weise wird auf die Daten zur zeitlichen Änderung der Partikelfeuchte zurückgegriffen. Der allgemeine Zusammenhang zwischen den oben genannten Größen wird durch den folgenden Ausdruck

$$A(X(t), T(t)) \quad (4.24)$$

dargelegt.

Der klassische Ansatz zur Beschreibung von Inaktivierungskinetiken ist die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit, in diesem Fall der Inaktivierungsgeschwindigkeit. Die Inaktivierung der Mikroorganismen, hervorgerufen durch die Trocknung, wird als Reaktion erster Ordnung angenommen. Bei dieser ist die Inaktivierungsgeschwindigkeit einzig abhängig von der Lebendzellzahlkonzentration. Die zeitliche Abnahme der Lebendzellzahlkonzentration in Abhängigkeit von der Inaktivierungsgeschwindigkeit  $k_t$  wird mit Hilfe der Gleichung

$$\frac{dA}{dt} = -k_t \cdot A \text{ mit } T = konst \quad (4.25)$$

ausgedrückt. Erfolgt die Bestimmung der Inaktivierungskonstanten durch diesen Ausdruck, impliziert die Konstante  $k_t$  alle möglichen Schädigungsfaktoren. Eine Unterscheidung zwischen der thermischen und der durch den Wasserentzug hervorgerufenen Beanspruchung ist somit nicht möglich.

Eine Möglichkeit sowohl die thermische als auch die Inaktivierung der Dehydrierung getrennt voneinander zu betrachten, besteht in der Modifizierung der Gleichung 4.25 zu:

$$\frac{dA}{dX} = k_X \cdot A(X) \quad (4.26)$$

Mit Hilfe dieser Gleichung wird die Änderung der Lebendzellzahlkonzentration in Abhängigkeit von der Partikelfeuchte bei konstanter Temperatur bestimmt. Anschließend wird die Gleichung 4.25 abermals modifiziert und hierbei die Änderung der Lebendzellzahlkonzentration auf die Temperatur bei gleichbleibender Partikelfeuchte bezogen:

$$\frac{dA}{dT} = -k_T \cdot A(T) \text{ mit } X = \text{konst.} \quad (4.27)$$

Somit ergibt sich der Gesamtausdruck:

$$\frac{dA}{dt}(X(t), T(t)) = \left( \frac{\partial A(t)}{\partial X(t)} \right)_T \frac{dX}{dt} + \left( \frac{\partial A}{\partial T} \right)_X \frac{dT}{dt}. \quad (4.28)$$

Die Kombination der Gleichungen 4.26 und 4.27 führt zu

$$\frac{dA(t)}{dt} = \left( k_X \frac{dX}{dt} - k_T \frac{dT}{dt} \right) A(t), \text{ mit } A(0) = 1. \quad (4.29)$$

Gleichung 4.29 erfasst zum Einen die thermische Inaktivierung in Verbindung mit der Temperaturänderung in der Wirbelschicht. Zum Anderen findet auch, unter Kenntnis der zeitlichen Änderung der Partikelfeuchte, die durch Wasserentzug hervorgerufene Inaktivierung Berücksichtigung. So entsteht ein gekoppeltes Modell, bestehend aus dem Wirbelschichttrocknungs- und Inaktivierungsmodell.

### 4.3 Lösung mathematischer Bilanzgleichungen

Bei den aufgestellten Bilanzgleichungen handelt es sich um gekoppelte Gleichungssysteme, welche sich zum Teil aus gewöhnlichen und partiellen Differentialgleichungen zusammensetzen. Insgesamt existieren darin zwei unabhängige Variablen, die Zeit  $t$  und der Ort  $z$ . Dabei wird die Zeit mit der gewöhnlichen und der Ort zusätzlich mit der partiellen Differentialgleichung ausgedrückt. Das Lösen der Gleichungen soll numerisch erfolgen. Zum Lösen der gekoppelten Differentialgleichungssysteme wird eine Diskretisierung der Höhenelemente im Wirbelschichtmodell vorgenommen. Diese wird durch das Einführen von sogenannten Stützstellen erreicht. Dabei erfolgt die Diskretisierung durch die Bildung von Differenzenquotienten, zum Beispiel:

$$\frac{\partial \vartheta}{\partial z} = \frac{\vartheta_z - \vartheta_{z-\Delta z}}{\Delta z}. \quad (4.30)$$

Auf diese Weise kann mit Hilfe der Diskretisierung eine partielle Differentialgleichung in  $n$  gekoppelte gewöhnliche Differentialgleichungen umgewandelt werden. Dadurch bleibt die Zeit als eine unabhängige Variable übrig. Des Weiteren werden für die Randbedingungen am Ein- und Austritt modifizierte Gleichungen in das Gleichungssystem eingesetzt. Dadurch wird aus einem Anfangs- und Randwertproblem ein reines Anfangswertproblem.

Die numerische Lösung der Bilanzgleichungen erfolgt mit der Software MATLAB unter Zuhilfenahme des Löfers ode15s. Dieser koppelt das Runge-Kutta-Verfahren mit einem BDF-Verfahren (BDF = Backward Difference Formula). Bevor der numerische Löser aufgerufen wird, werden zunächst Eingabewerte und Konstanten in Funktionen festgelegt, welche später im Hauptprogramm ausgelesen werden. Aus den Eingabewerten werden die Anfangswert- und Randbedingungen im Hauptprogramm generiert sowie die Differentialgleichungssysteme an ode15s übergeben. Alle in den Funktionen und Differentialgleichungssystemen gespeicherten Korrelationen für den Wärme- und Stoffübergang sowie die zugehörigen Stoffwerte werden zu jedem Zeitschritt erneut bestimmt. Die Gleichungen zu den relevanten Stoffwerten und Korrelationen sind im Anhang dieser Arbeit zu finden.

## Kapitel 5

# Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Fermentations- und Granulierungsergebnisse aus den Experimenten gezeigt, bei denen zunächst der Milchsäurebakterienstamm *L.plantarum* als Modellorganismus diente. Im Anschluss daran werden die ermittelten Prozessparameter aus den Trocknungsexperimenten auf *L.paracasei* übertragen. Im Rahmen der Fermentationsexperimente wird die benötigte Biomasse für die Trocknung erzeugt. Weiterhin wird untersucht, inwieweit sich unterschiedliche Fermentationsbedingungen auf den Zustand der Zellen nach der Trocknung auswirken. Zunächst werden die charakteristischen Wachstumsverläufe der Bakterien aus Kultivierungen im Schüttelkolben und Bioreaktor abgebildet. Dabei werden bei der Kultivierung im Bioreaktor die Wachstumsverläufe von pH-Wert geregelt und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen gezeigt.

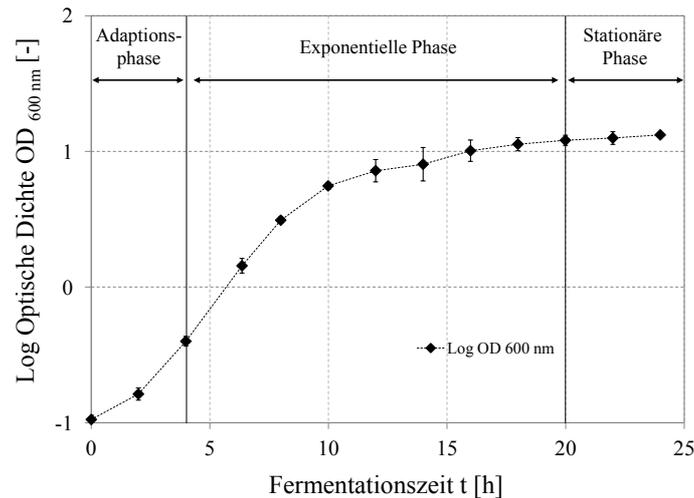
An die Fermentationsexperimente schliessen sich die Granulierungs- beziehungsweise Trocknungsexperimente in der Wirbelschicht an. Hierbei wird untersucht, welche Auswirkungen unterschiedliche Prozessbedingungen auf die Überlebensrate von *L.plantarum* unter Einsatz von diversen Trägermaterialien und Schutzstoffen nach der Trocknung haben. Ein weiteres Augenmerk wird auf die Viabilität während der Lagerung gelegt. Hierbei wird untersucht, welchen Einfluss Lagerungstemperaturen und Umgebungsfeuchten auf die Stabilität der Bakterien haben und in welchem Maße die Inaktivierung in Abhängigkeit davon voranschreitet. In diesem Zusammenhang wird gezeigt, wie wichtig die Wahl eines geeigneten Trägermaterials, Schutzstoffes und die Lagerungsbedingungen für den Zellerhalt während und nach der Trocknung sind.

### 5.1 Fermentation

Zur Erzeugung von Biomasse von *L.plantarum* werden Kultivierungen im Schüttelkolben und Bioreaktor wie in den Abschnitten 3.4.3 und 3.4.4 erläutert, durchgeführt. Zu Beginn jeder Kultivierung wird das Inokulumvolumen nach der Gleichung 3.1 zum Animpfen des Schüttelkolbens beziehungsweise des Bioreaktors berechnet. Dabei wird im jeweiligen Kultivierungsgefäß eine  $OD_{600}^{Start\ Rea/Sch}$  von 0,1 eingestellt. Dies entspricht einer Anfangszellkonzentration von *L.plantarum* im MRS-Medium von  $10^7$  KbE/ml.

### 5.1.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Kultivierung im Schüttelkolben erfolgt ohne Begasung bei 30 °C, einer Schüttelfrequenz von 150 rpm und ohne Zugabe eines Neutralisationsmittels zur Regelung des pH-Wertes. In Abbildung 5.1 ist der Wachstumsverlauf, in Form der Änderung der optischen Dichte, von *L.plantarum* aus einer ein Liter Schüttelkolben-Kultivierung über 24 Stunden dargestellt.



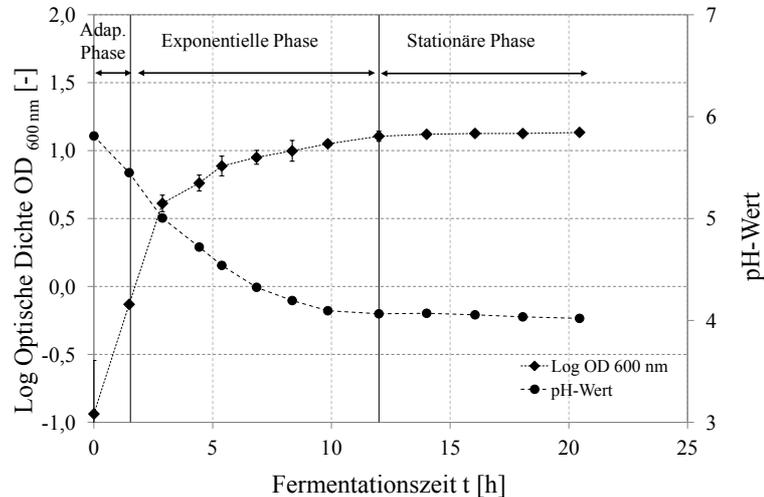
**Abbildung 5.1:** Darstellung des Wachstumsverlaufs von *L.plantarum* kultiviert im Schüttelkolben im 1 l Maßstab in MRS-Bouillon, T = 30°C, Rührerdrehzahl = 150 rpm, ohne Begasung und Neutralisation (n = 3)

Abbildung 5.1 zeigt den in Abbildung 2.4 zuvor vorgestellten, für Mikroorganismen charakteristischen Wachstumsverlauf mit seinen unterschiedlichen Wachstumsphasen. *L.plantarum* befindet sich vier Stunden in der Adaptionen-, 16 Stunden in der exponentiellen und ab 20 Stunden in der stationären Wachstumsphase. Für die Granulierungsexperimente werden die Bakterien nach 20 Stunden, in der frühen stationären Phase, geerntet. Nach dieser Zeit beträgt die Zellkonzentration im Medium  $10^9$  KbE/ml. Die Durchführung der Ernte ist im Abschnitt 3.4.3.2 detailliert beschrieben. Am Ende der Kultivierungszeit ist der pH-Wert des Mediums durch die von den Bakterien gebildete Milchsäure von pH-Wert = 5,8 auf 4,1 abgesunken. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die nach der Gleichung 3.3 ermittelte Biotrockenmassekonzentration  $c_{BTM}[g/l]$  von *L.plantarum*  $2,30 \pm 0,03$  g/l.

### 5.1.2 Kultivierung im 2 l Bioreaktor

Im zwei Liter Bioreaktor werden sowohl pH-Wert geregelte als auch pH-Wert unregelte Kultivierungen durchgeführt. Die Ergebnisse zum Wachstumsverlauf einer zwei Liter Fermentation von *L.plantarum* ohne Begasung bei T = 30 °C, einer Rührerdrehzahl von 200 rpm und ohne Zugabe eines Neutralisationsmittels sind in Abbildung 5.2 zu sehen. Darüber

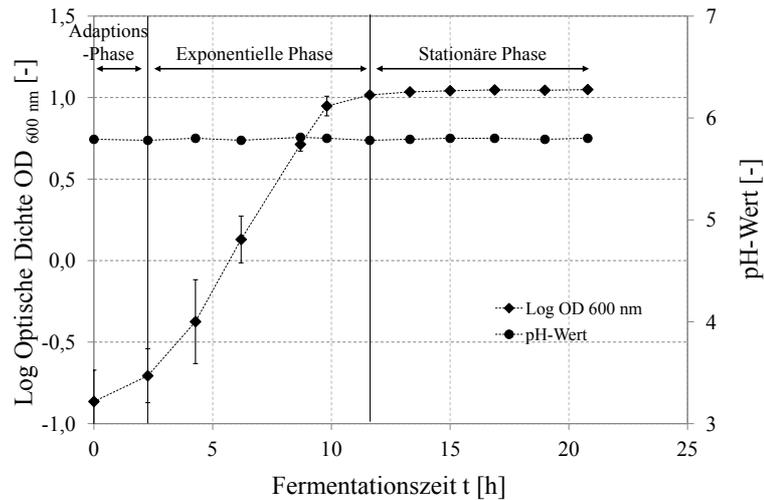
hinaus ist in dieser Abbildung der Wachstumsverlauf in die einzelnen Wachstumsphasen unterteilt.



**Abbildung 5.2:** Darstellung der Wachstumskurve aus einer 2 l- Bioreaktor Kultivierung von *L.plantarum*,  $T = 30^{\circ}\text{C}$ , Rührerdrehzahl = 200 rpm, ohne Begasung und Neutralisation ( $n = 3$ )

Der Wachstumsverlauf von *L.plantarum* in Abbildung 5.2 unterscheidet sich zu dem in Abbildung 5.1 in den nachfolgend erläuterten Punkten. Der erste Unterschied liegt in der Dauer der Adaptionsphase von *L.plantarum*, die eine Dauer von zwei Stunden aufweist. Im Anschluss erfolgt der Übergang der Bakterien in die exponentielle Wachstumsphase. Hier wird nach zwölf Stunden Fermentationsdauer die stationäre Phase erreicht. Analog zu der Ernte der Bakterien im Schüttelkolben erfolgt diese in der frühen stationären Phase. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Zellkonzentration von *L.plantarum*  $10^9$  KbE/ml und es wird eine Biotrockenmassekonzentration in Höhe von  $c_{BTM} = 2,41 \pm 0,09$  g/l ermittelt. Nach der Ernte werden die Bakterien gekühlt und durch Zentrifugation von ihren Medienbestandteilen getrennt.

Bei den pH-Wert geregelten Fermentationen wird der pH-Wert während der gesamten Fermentationsdauer durch die Zugabe einer 1 molaren NaOH-Lösung auf einen pH-Wert in Höhe von 5,8 geregelt. Der Wachstumsverlauf von *L.plantarum* aus einer pH-Wert geregelten Kultivierung ohne Begasung bei  $T = 30^{\circ}\text{C}$  und einer Rührerdrehzahl von 200 rpm ist in Abbildung 5.3 dargelegt.



**Abbildung 5.3:** Darstellung der Wachstumskurve aus einer 2 l- Bioreaktor Kultivierung von *L.plantarum*,  $T = 30^{\circ}\text{C}$ , Rührerdrehzahl = 200 rpm, ohne Begasung und mit 1 M NaOH-Lösung als Neutralisationsmittel ( $n = 3$ )

Wie aus Abbildung 5.3 zu erkennen ist, ähnelt der Wachstumsverlauf von *L.plantarum* dem aus den pH-Wert unregulierten Fermentationen. Die Zellen befinden sich zwei Stunden in der Adaptionphase, bevor sie in die exponentielle Phase übergehen. Die Dauer der exponentiellen Phase beläuft sich auf zehn Stunden. Nach dieser Zeit beginnt die stationäre Wachstumsphase. Die Ernte der Bakterien erfolgt auch hier in der frühen stationären Phase, nach zwölf Stunden. Die Zellkonzentration verändert sich. Diese erhöht sich und beträgt nach zwölf Stunden Fermentationsdauer  $10^{10}$  KBE/ml. Zusätzlich werden höhere Biotrockenmassekonzentrationen von *L.plantarum* in Höhe von  $c_{BTM} = 3,72 \pm 0,21$  g/l ermittelt. Eine Ursache hierfür könnte bei der Herstellung des Mediums liegen. Bevor das Medium für die Kultivierung genutzt werden kann, muss es zuvor im Autoklaven bei  $121^{\circ}\text{C}$  sterilisiert werden. Dabei kann es zu Unterschieden in der Abkühlzeit kommen, die sich in der Glukosekonzentration bemerkbar machen. Vermutlich ist die höhere Zell- und Biotrockenmassekonzentration bei dem pH-Wert geregelten Fermentationen auf eine höhere Glukosekonzentration im Medium zurückzuführen.

Der Grund für das schnellere Erreichen der frühen stationären Phase im Bioreaktor ist die bessere Durchmischung, hervorgerufen durch den Einsatz von Scheibenrührern und der höheren Rührerdrehzahl von 200 rpm. Dadurch werden die Nährstoffe im Medium besser verteilt und die Bakterien können die Nährstoffe schneller aufnehmen. Dies führt zu einer kürzeren Adaptionphase, welche in den Abbildungen 5.1, 5.2 und 5.3 hervorgehoben sind. Die Adaptionphase verkürzt sich von vier auf zwei Stunden. Bei der Kultivierung im Schüttelkolben zeigt der Wachstumsverlauf von *L.plantarum* einen flacheren Anstieg in der exponentiellen Phase als im Bioreaktor. Das bedeutet, es findet ein langsames Wachstum statt. Anhand des Verlaufes ist nicht eindeutig erkennbar, ob die frühe stationäre Phase bei der Schüttelkolbenkultivierung bereits nach 20 Stunden erreicht ist. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Wachstum der Zellen an diesem Punkt beendet war. Jedoch sprechen die vergleichbaren Biotrockenmassekonzentrationen aus der

nicht pH-Wert geregelten Schüttelkolben- und Bioreaktorkultivierung dafür. Prinzipiell besteht das Bestreben, höchstmögliche Biomasseausbeuten durch optimale Fermentationsbedingungen zu erzeugen. Demnach ist die pH-Wert geregelte Fermentation auf Grund der kürzeren Prozesszeiten und höheren Biomasse zu empfehlen. Jedoch wurden für die sich anschließende Trocknung die Bakterien von den nicht pH-Wert geregelten Kultivierungen aus dem Schüttelkolben und Bioreaktor verwendet. Der Grund dafür liegt in der mangelnden Möglichkeit der Kultivierungen, da lediglich ein zwei Liter Bioreaktor und mehrere Schüttelkolben zur Verfügung standen. Bezüglich der Schüttelkolbenkultivierung erweist sich infolge von fehlenden Inline-Messsonden eine pH-Wert Regelung als schwierig. Zusätzlich würde die Bestimmung des pH-Wertes durch eine pH-Wert Sonde und die Zugabe des Neutralisationsmittels das Öffnen des Deckels bedeuten, wodurch es zu Kontaminationen im Kultivierungsmedium kommen könnte. Um diese Gefahren auszuschließen, wurde hier auf eine pH-Wert Regelung verzichtet. Hinsichtlich des Bestrebens ausreichend Biomasse durch vergleichbare Kultivierungen mit ähnlichen Prozessbedingungen bereit zu stellen, erfolgt daher die Erzeugung der Biomasse hauptsächlich durch nicht pH-Wert geregelte Kultivierungen.

## 5.2 Einfluss der Trocknung auf die Viabilität

### 5.2.1 Niedertemperaturgranulierung

Für die Granulierung von *L.plantarum* liegt zu Beginn der Versuchsreihen der Fokus auf der Wahl eines geeigneten Trägermaterials. Als Trägermaterialien kommen Zuckerpellets, Laktose und Maltodextrin zum Einsatz, da diese sich laut Bhandari et al. (1997), (Chávez and Ledebor, 2007), (Kurtmann et al., 2009) hervorragend als Schutz- beziehungsweise Trägerstoffe für die Trocknung von Mikroorganismen eignen. Von den entsprechenden Materialien wird jeweils ein Kilogramm in die Wirbelschichtanlage vorgelegt.

Aus den Arbeiten von Carvalho et al. (2004) und Bolla et al. (2011) ist bekannt, dass Mikroorganismen unterschiedlich auf verschiedene Schutz- sowie Trägerstoffe reagieren und dadurch die Viabilität nach der Trocknung beeinflusst wird. Daher sollten für jeden Bakterienstamm die geeigneten Schutz- und Trägerstoffe experimentell bestimmt werden. Für die Prüfung der Eignung der genannten Materialien als Trägerstoff für *L.plantarum* werden die Bakterien zunächst unter Einsatz dieser getrocknet. Im Anschluss daran werden die Lebendzellzahlen von *L.plantarum* bestimmt. Parallel zur Prüfung der Trägermaterialien werden die Eindüsungszeiten variiert und der Einfluss geringerer Eindüsungszeiten auf die Zellviabilität nach der Trocknung analysiert.

Für den Vergleich der Ergebnisse werden bei allen Versuchen die gleichen Bedingungen eingestellt. Dadurch bleiben Prozessparameter wie Gaseintrittstemperatur (40 °C), Sprühdruk (4 bar) und -rate (270 g/h) sowie die Nachtrocknungszeit (10 min) unverändert. Zusätzlich werden je Experiment immer 1 kg Trägermaterial verwendet. Lediglich der Gasmassenstrom variiert in Abhängigkeit von den verwendeten Trägermaterialien und divergiert zwischen 75 und 100 kg/h. Die Angaben der Eindüsungszeiten bedeuten, dass unterschiedliche Granulierungszeiten getestet wurden, wobei diese zu Beginn der Versuche bei 180 Minuten lagen. Infolge der aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse reduzierte

sich diese auf Grund von höheren erzielten Überlebensraten auf 20 Minuten. Zeitgleich konnte festgestellt werden, welche Trägermaterialien sich für die Trocknung und Lagerung von *L.plantarum* am besten eignen. In den nachfolgenden Versuchen wurde auf die Ungeeigneten verzichtet. Eine Gesamtübersicht aller verwendeten Trägermaterialien und differierenden Prozessparameter enthält die Tabelle 5.1.

**Tabelle 5.1:** Alle verwendeten Trägermaterialien und eingestellten Prozessparameter der durchgeführten Versuchsreihe zur Niedertemperaturgranulierung von *L.plantarum*

Versuch	Trägermaterial	$t_{eind}$ [min]	$\dot{M}_L$ [kg/h]	$V_{Spr}$ [ml]	$m_{prot}$ [g]
100520A	Zuckerpellets	180	100	810	-
100520B	Maltodextrin	180	85	810	-
100812B	Laktose	60	75	270	10 <sub>T</sub>
100826A	Maltodextrin	60	85	270	10 <sub>T</sub>
100826B	Zuckerpellets	60	100	270	10 <sub>T</sub>
100810A	Laktose	40	75	180	10 <sub>T</sub>
100909A	Laktose/Maltodextrin	40	80	180	10 <sub>T</sub>
100909B	Maltodextrin	40	85	180	10 <sub>T</sub>
110512A	Maltodextrin	30	85	135	10 <sub>T</sub>
101202B	Maltodextrin	30	85	135	10 <sub>S</sub>
101021A	Maltodextrin	20	85	90	10 <sub>S</sub>
110714	Maltodextrin	20	85	90	-

T: Trehalose

S: Sorbitol

In Abhängigkeit von der Eindüsenzeit bei gleichbleibender Sprühdrate ergibt sich das jeweilige Sprühvolumen. Dabei handelt es sich um das Volumen der Bakteriensuspension, welches auf das in der Wirbelschicht vorgelegte Trägermaterial gesprüht wird. Bei langen Prozesszeiten wird daher ein größeres Volumen der Bakteriensuspension eingedüst als bei kürzeren. Jede Bakteriensuspension enthält die Bakterienmasse aus einem zwei Liter Kultivierungsansatz. Zunächst werden in den folgenden Experimenten für die Granulierungen ausschließlich Bakterien verwendet, bei denen der pH-Wert während der Kultivierung nicht geregelt wird. Für eine nicht pH-Wert geregelte zwei Liter Schüttelkolbenkultivierung ergibt sich somit für jedes Experiment, ausgehend von der zuvor ermittelten Biotrockenmassekonzentration von  $c_{BTM} = 2,30 \pm 0,03$  g/l, eine Gesamtbakterienmasse von 4,6 g. Hingegen berechnet sich bei einer nicht pH-Wert geregelten Fermentation im zwei Liter Bioreaktor eine Biotrockenmassekonzentration von  $c_{BTM}=2,41 \pm 0,09$  g/l und somit eine Gesamtbakterienmasse in Höhe von 4,8 g.

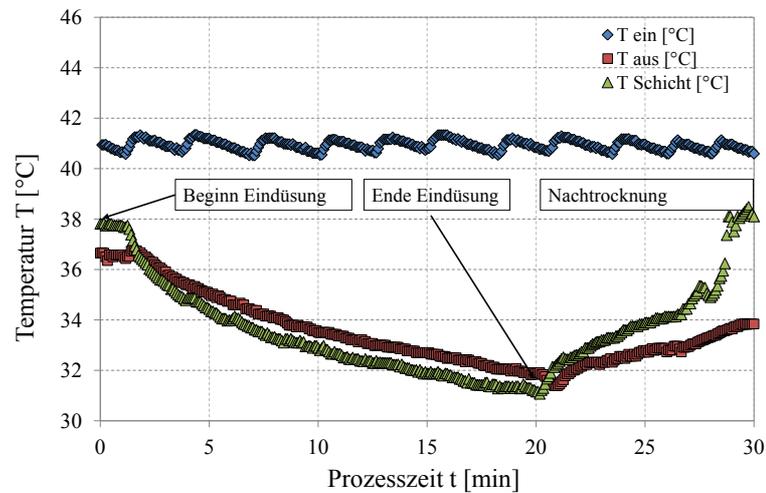
Zur Herstellung der Sprühlösung werden die 4,6 g beziehungsweise 4,8 g der Bakterien mit einer PBS-Lösung verdünnt und auf das entsprechende Sprühvolumen eingestellt. Bei Verwendung von Schutzstoffen wird zusätzlich die Masse an Schutzstoff vor der Trocknung abgewogen und der Bakteriensuspension hinzugegeben. Die genauen Angaben zur Herstellung der Bakteriensuspension können dem Abschnitt 3.5.3 entnommen werden. Wie bereits beschrieben, umfasst die Niedertemperaturgranulierung von *L.plantarum* drei

Arbeitsschritte. Der erste Arbeitsschritt ist die 15 minütige Sterilisierung der Wirbelschichtanlage bei 121 °C Betttemperatur. Im zweiten Arbeitsschritt wird die vorbereitete Bakteriensuspension in die Wirbelschichtanlage eingedüst. Die Nachtrocknung der hergestellten bioaktiven Granulate erfolgt im dritten und letzten Arbeitsschritt. Dabei ergeben sich entsprechende Prozessparameterverläufe, die zur Prozessüberwachung genutzt werden. Die Temperaturprofile stellen bei der Trocknung von prokaryotischen Mikroorganismen einen wichtigen Parameter zur Prozessüberwachung dar. Dabei darf die Temperatur in der Produktkammer niemals die maximale Wachstumsgrenze der Bakterien, im Falle von *L.plantarum* 45 °C, überschreiten. Sollten Temperaturüberschreitungen eintreten, reagieren die Bakterien beispielsweise mit Denaturierungen der Proteine oder Zellmembranschäden, die sich wiederum negativ auf die Viabilitäten nach der Trocknung und während der Lagerung auswirken.

Anhand der Daten, die mit der Messdatenerfassungssoftware DASyLab11 aufgenommen wurden, werden im Folgenden die Temperaturprofile der Arbeitsschritte zwei (Eindüsen) und drei (Nachtrocknung) von einem Granulierungsexperiment bei einer Prozesszeit von 20 Minuten und einer Nachtrocknungszeit von zehn Minuten in Abbildung 5.4 erläutert. Die Verläufe aus den übrigen Experimenten werden in dieser Arbeit nicht gezeigt, da sich auf Grund der gleichen Eintrittstemperaturen, Sprühdreue und Eindüsungsraten ähnliche Temperatur- und Gasfeuchteverläufe ergeben. Diese können als Garantie dafür angesehen werden, dass die Trocknung unterhalb von 40 °C erfolgte. Die relevanten Prozessgrößen und Materialien sind in Tabelle 5.2 aufgelistet.

**Tabelle 5.2:** Trägermaterialien und Prozessparameter vom Versuch 110714

Trägermaterial	Maltodextrin
Eindüsungszeit $t_{eind}$ [min]	20
Nachtrocknungszeit $t$ [min]	10
Gaseintrittstemperatur $\vartheta_{ein}$ [°C]	40
Sprühdreue $p_{Spr}$ [bar]	4
Eindüsungsrate $\dot{M}_{Spr}$ [g/h]	270
Gasmassenstrom $\dot{M}_L$ [kg/h]	85
Volumen der Bakteriensuspension $V_{Spr}$ [ml]	90
Feststoffgehalt der Suspension $x_{fest}$ [-]	0,1
Masse Trägermaterial $m_P$ [g]	1000
Masse Schutzstoff $m_{pro}$ [g]	-



**Abbildung 5.4:** Darstellung der Verläufe der Gaseintritts-, Schicht- und Gasaustrittstemperatur bei der Granulierung von *L. plantarum* bei einer Eindüsungszeit von 20 Minuten und einer Nachtrocknungszeit von zehn Minuten

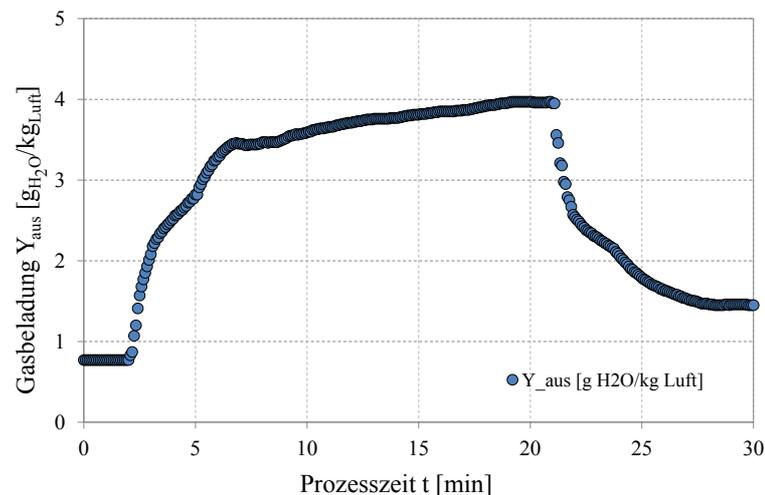
In der Abbildung 5.4 sind die Temperaturverläufe der Gaseintritts-, Gasaustritts- und Schichttemperaturen über eine Gesamtprozesszeit von 30 Minuten dargestellt. Eine Gaseintrittstemperatur  $T_{ein}$  in Höhe von 40 °C, im Diagramm blau gekennzeichnet, wird an der Steuerkonsole der Wirbelschichtanlage eingestellt. Diese schwankt während des gesamten Prozesses zwischen den Werten 40,5 und 41,0 °C. Die Temperaturen in der Produktkammer  $T_{sch}$  und am Austritt  $T_{aus}$  liegen unterhalb der Eintrittstemperatur. Mit Beginn der Eindüsung und in Abhängigkeit von den eingestellten Prozessparametern wie Gaseintrittstemperatur, Gasmassenstrom, Sprühdichte und Feststoffgehalt der Bakteriensuspension sinken nach einer Eindüsungszeit von zwei die Temperaturen in der Produktkammer und am Austritt. Ein Grund dafür ist die zunehmende Benetzung der Partikel während des EindüSENS. Mit größer werdender Benetzung der Partikel mit Wasser nimmt die Feuchtigkeit im Gas zu. Dies führt zu einer Abnahme der Lufttemperatur in der Schicht und am Austritt.

In dem gezeigten Bereich ist die Schichttemperatur zu Beginn der Eindüsung bis zur zweiten Minute und in der Nachtrocknungszeit größer als die Gasaustrittstemperatur. Während der Eindüsung kommt es jedoch zur Umkehrung des Verlaufes, und die Schichttemperatur wird kleiner als die Gasaustrittstemperatur. Diese Effekte sind kaum schlüssig zu deuten, weil gemessene Schichttemperaturen irgendwo zwischen Gastemperatur und Partikeltemperatur liegen. Die Partikeltemperatur ist bei vollständiger Benetzung gleich der adiabatischen Sättigungstemperatur, bei unvollständiger Benetzung liegt sie ihrerseits irgendwo zwischen adiabatischer Sättigungstemperatur und Gastemperatur. Dadurch, und da die Gastemperatur ortsabhängig ist, kann die gemessene Schichttemperatur, abhängig vom Ort der Messung und von den Betriebsbedingungen, recht beliebig im Vergleich zur Gasaustrittstemperatur platziert sein, was man auch in Abbildung 5.4 beobachtet. Daher haben gemessene Schichttemperaturen keinen besonders hohen Stellenwert, klarer definiert und wichtiger ist die Messung der Gasaustrittstemperatur.

Nach Beendigung der zwanzigminütigen Eindüsungphase ergeben sich in der Wirbelschicht, für das oben gezeigte Beispiel, Temperaturen in Höhe von  $32\text{ °C}$ . Im Falle der adiabatischen Sättigung ergibt sich bei einer Eintrittstemperatur von  $40\text{ °C}$  eine Sättigungstemperatur von  $T_{as} = 14,8\text{ °C}$  und eine Gasfeuchte von  $Y_{as} = 10,7\text{ gH}_2\text{O/kgL}$ . Dabei handelt es sich um die minimal mögliche Temperatur und die maximal mögliche Gasfeuchte.

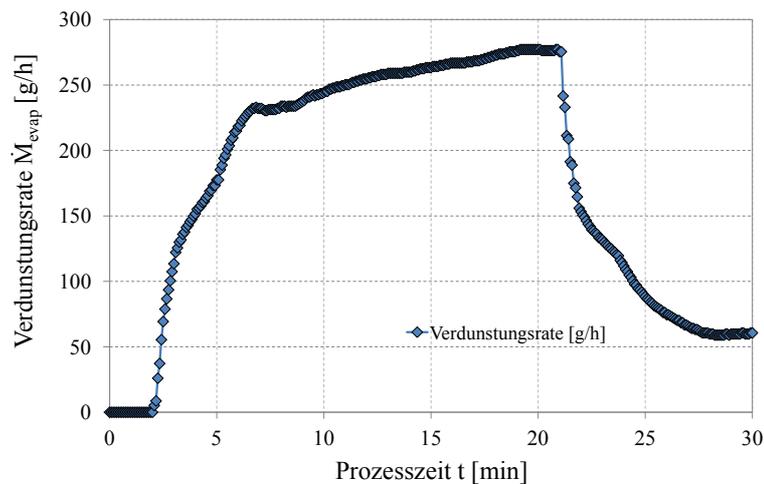
Im Anschluss an die Eindüsung beginnt die zehnmünütige Nachtrochnungszeit, in der die Temperaturen sowohl in der Produktkammer als auch am Austritt wieder ansteigen. Bei diesem Abschnitt wird angenommen, dass es sich, wie eingehend in Abschnitt 2.2.1 erläutert, um den zweiten Trocknungsabschnitt handelt. In diesem nehmen die partikelinneren Widerstände zu und es wird weniger Feuchte nach Außen transportiert. Dadurch sinkt die Trocknungsgeschwindigkeit und die Feuchte im Gas nimmt ab. Dies wiederum resultiert in einer Erhöhung der Schicht- und Gasaustrittstemperatur. Die am Ende der Nachtrochnungszeit erreichten Temperaturen, von  $38\text{ °C}$  in der Produktkammer und  $34\text{ °C}$  am Austritt, liegen unterhalb der Eintrittstemperatur von  $40\text{ °C}$ . Dadurch wird eine Trocknung garantiert, die unterhalb der maximalen Wachstumsgrenze von  $45\text{ °C}$  liegt.

Ein zweiter wichtiger Parameter zur Überwachung des Prozesses ist die bereits erwähnte Gasfeuchte. Diese wird am Austritt der Anlage gemessen und durch das Symbol  $Y_{aus}$  ausgedrückt. Mit Beginn der Eindüsung steigt die Gasfeuchte bis zum Erreichen eines annähernd konstanten Niveaus an. Die Ursache dafür liegt, wie eingangs erwähnt, an der während des EindüSENS zunehmenden Benetzung der Granulate. Nach einer EindüSungszeit von 20 Minuten wird eine relative Feuchte von 15 % im Gas erreicht. Mit Beendigung der EindüSungszeit beginnt die Nachtrochnungszeit, in der die Gasfeuchte auf einen je nach vorgegebener Trocknungsdauer und Gasmassenstrom bestimmten Wert abfällt. Der zeitliche Verlauf der Gasfeuchte für den Granulierungsprozess mit anschließender Nachtrochnung kann in Abbildung 5.5 nachverfolgt werden.



**Abbildung 5.5:** Darstellung der Gasfeuchte bei der Granulierung von *L.plantarum* bei einer EindüSungszeit von 20 Minuten und einer Nachtrochnungszeit von zehn Minuten

Wie aus Abbildung 5.5 zu erkennen ist, beträgt die Gasfeuchte, welche am Austritt der Wirbelschichtanlage gemessen wird vor Beginn der Eindüsung  $Y_{ein} = 0,8 \text{ g}_{H_2O}/\text{kg}_{Luft}$ . Die Gasaustrittsfeuchte steigt infolge der Wasserverdunstung bei zunehmender Benetzung der Partikeloberfläche an und erreicht nach 20 Minuten einen Wert in Höhe von  $Y_{aus} = 4,0 \text{ g}_{H_2O}/\text{kg}_{Luft}$ . Mit Beendigung der Eindüsung schließt sich die Nachdrossung an. Hierbei sinkt die Gasfeuchte kontinuierlich ab und erreicht nach zehn Minuten  $Y_{aus} = 1,4 \text{ g}_{H_2O}/\text{kg}_{Luft}$ .



**Abbildung 5.6:** Darstellung des verdunsteten Wassermassenstromes bei der Granulierung von *L.plantarum* bei einer Eindüsungzeit von 20 Minuten und einer Nachdrossungszeit von zehn Minuten

Angesichts des Zusammenhangs zwischen der Gasfeuchte und dem verdunsteten Wassermassenstrom ergibt sich bei der Darstellung der Verdunstungsrate in Abbildung 5.6 ein ähnlicher Verlauf. Die Verdunstungsrate steigt mit Beginn der Eindüsung durch die Zunahme der Benetzung kontinuierlich an. Nach etwa zehn Minuten erlangt sie ein nahezu konstantes Niveau im Größenbereich von 250 bis 280 g/h. Nach Beendigung der Eindüsung sinkt diese wieder und erreicht nach der zehnmütigen Nachdrossungszeit eine Verdunstungsrate von  $\dot{M}_{evap} = 60 \text{ g/h}$ .

Im nachfolgenden Abschnitt erfolgt die Darstellung der Ergebnisse aus den Granulierungsexperimenten von *L.plantarum* unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verweilzeiten der Produkte in der Wirbelschichtanlage und der Verwendung der oben genannten Trägermaterialien. Dabei werden die sich in Abhängigkeit von den Verweilzeiten und dem Trägermaterial ergebenden Viabilitäten nach der Trocknung dargelegt und die ermittelten Wassergehalte und -aktivitäten der bioaktiven Granulate genannt. Zusätzlich wird der Einfluss von Schutzstoffen auf die Viabilität von *L.plantarum* nach der Trocknung gezeigt.

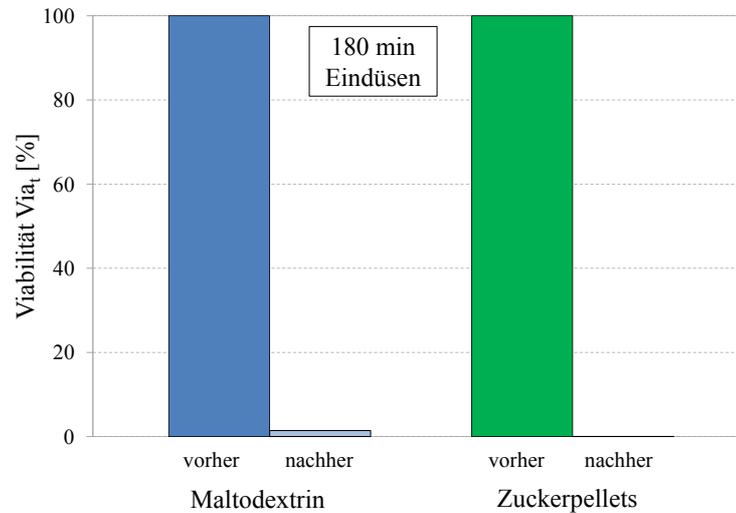
### 5.2.2 Variation der Verweilzeiten, Trägermaterialien und Schutzstoffe

In diesem Abschnitt wird untersucht, welche Trägermaterialien sich für die Granulierung und Trocknung von *L.plantarum* eignen. Da sowohl die Eindüsung- als auch die Nach-trocknungszeit verantwortlich für die Viabilitätsverluste während der Wirbelschicht-trocknung von bioaktiven Substanzen sind, wird in diesem Abschnitt untersucht, bei welchen Eindüsungzeiten die Inaktivierung am geringsten ist.

#### 180 Minuten Eindüsung

In dieser Versuchsreihe wird zunächst die Viabilität von *L.plantarum* nach der Granulierung unter Anwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets untersucht. Von der zuvor geernteten und aufkonzentrierten Bakterienmasse werden durch die Zugabe einer PBS-Lösung 810 ml Bakteriensuspension hergestellt. Diese wird mit einer Eindüsungsrate von  $\dot{M}_{spr} = 270$  g/h, einer Gaseintrittstemperatur von 40 °C und einem Sprühdruk von  $p_{spr} = 4$  bar 180 Minuten in die Wirbelschichtanlage eingedüst und im Anschluss zehn Minuten nachgetrocknet. Die Prozessparameter können der Tabelle 5.1 entnommen werden.

In der Abbildung 5.7 sind die Viabilitäten von *L.plantarum* vor und nach der Wirbelschicht-trocknung bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets in Form eines Säulendiagrammes dargestellt. Dabei werden die Lebendzellzahlen von *L.plantarum* in [KbE/g] vor der Trocknung als Bezugswert verwendet und entsprechen 100 %. Die zugehörigen Lebendzellzahlen in [KbE/g] nach der Trocknung sind zum Vergleich mit aufgeführt. Die Berechnungen zur Ermittlung der Lebendzellzahlen vor und nach der Trocknung erfolgen mit den Gleichungen 3.5, 3.6 und 3.8. Liegen drei unabhängig voneinander durchgeführte Wirbelschicht-trocknungsexperimente vor, erfolgt die Angabe und Darstellung der Viabilitäten nach der Trocknung unter Berücksichtigung der Messunsicherheiten. Dafür wird die Standardabweichung der ermittelten Lebendzellzahlen berechnet und diese vom Mittelwert subtrahiert. Somit handelt es sich bei den dargestellten Viabilitäten um die minimal erreichten Viabilitäten. Der Grund für dieses Vorgehen sind die großen Messunsicherheiten, die sich durch das angewandte Stapelplattenverfahren zur Bestimmung der Lebendzellzahl ergeben.



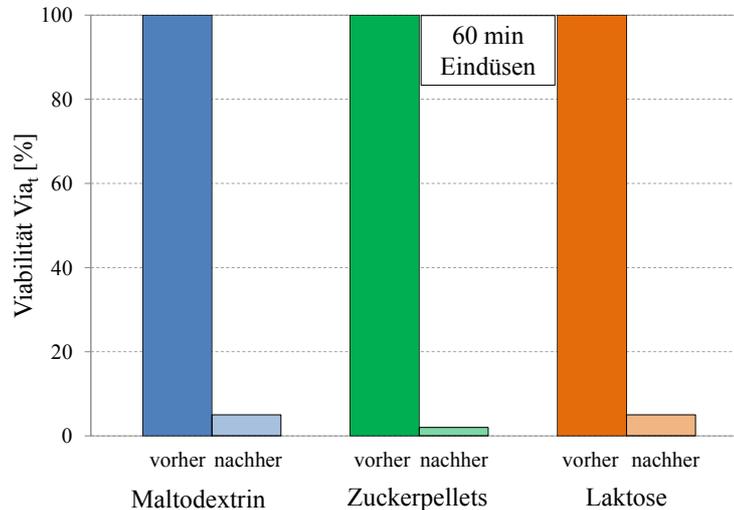
**Abbildung 5.7:** Viabilität von *L.plantarum* vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin und Zuckerpellets als Trägermaterialien bei einer Eindüsenzeit von 180 Minuten,  $T_{ein} = 40\text{ °C}$ ,  $p_{spr} = 4\text{ bar}$ ,  $\dot{M}_{spr} = 270\text{ g/h}$ ,  $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85\text{ kg/h}$  und  $\dot{M}_{L,Zuckerpellets} = 100\text{ kg/h}$ . Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten

Aus Abbildung 5.7 geht hervor, dass die Viabilitäten nach der Trocknung unabhängig vom verwendeten Trägermaterial erheblich sinken. Die Überlebensrate von *L.plantarum* nach der Trocknung auf dem Trägermaterial Maltodextrin beträgt 1,0 %. Bei Verwendung des Trägermaterials Zuckerpellets wird eine Viabilität von 0 % erreicht. Die Ermittlung der Restwassergehalte für die getrockneten bioaktiven Granulate ergibt für die aus Maltodextrin bestehenden Granulate Werte in Höhe von  $6,4 \pm 0,1\%$  und für die aus Zuckerpellets zusammengesetzten Granulate  $1,3 \pm 0,1\%$ . Die Wasseraktivität der bioaktiven Maltodextrin-Granulate beträgt  $0,25 \pm 0,2\%$ , wohingegen für die bioaktiven Zuckerpellet-Granulate die Wasseraktivität nicht gemessen wurde.

### 60 Minuten Eindüsung

Für die Untersuchung des Einflusses der Eindüsenzeit auf die Viabilität nach der Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum* wird die anfängliche Eindüsenzeit in Anbetracht der zuvor erreichten niedrigen Viabilitäten von 180 Minuten auf 60 Minuten herabgesetzt. Zudem wird Laktose als weiteres Trägermaterial eingesetzt. Darüber hinaus wird der Bakteriensuspension vor der Trocknung präventiv ein Zellschutzstoff hinzugefügt. Dafür werden 10 g von dem Schutzstoff Trehalose der Bakteriensuspension beigemischt. Die nun mit Trehalose versehene Bakteriensuspension wird erneut mit einer Eindüsenrate von  $\dot{M}_{spr} = 270\text{ g/h}$ , einem Sprühdruk von  $p_{spr} = 4\text{ bar}$  und einer Gaseintrittstemperatur von  $40\text{ °C}$  60 Minuten in die Anlage eingedüst und zehn Minuten nachgetrocknet. Der Gasmassenstrom variiert in Abhängigkeit vom verwendeten Trägermaterial zwischen 75 und 100 kg/h. Die Prozessparameter sind in der Tabelle 5.1 aufgelistet. Die Viabilitäten von *L.plantarum* bevor und nachdem sie 60 Minuten in die Wirbelschichtanlage eingedüst und 10 Minuten nachgetrocknet werden, bei Verwendung der jeweiligen Trägermaterialien

Maltodextrin, Zuckerpellets und Laktose sowie des Zellschutzstoffes Trehalose, sind in der Abbildung 5.8 dargestellt.



**Abbildung 5.8:** Viabilität von *L.plantarum* vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets und Laktose sowie des Zellschutzstoffes Trehalose bei einer Eindüsenzeit von 60 Minuten,  $T_{ein} = 40\text{ °C}$ ,  $p_{spr} = 4\text{ bar}$ ,  $\dot{M}_{spr} = 270\text{ g/h}$ ,  $\dot{M}_{L,Laktose} = 75\text{ kg/h}$ ,  $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85\text{ kg/h}$ ,  $\dot{M}_{L,Zuckerpellets} = 100\text{ kg/h}$ . Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten

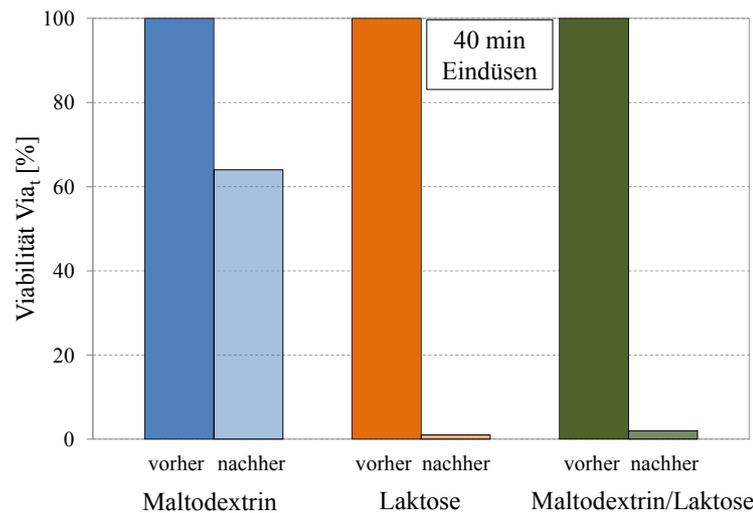
Wie in Abbildung 5.8 zu sehen ist, sinken die Viabilitäten von *L.plantarum* nach der Granulierung bei Verwendung von Maltodextrin, Zuckerpellets und Laktose unter Zuhilfenahme von Trehalose auf Werte  $< 10\%$  ab. Erfolgt die Trocknung von *L.plantarum* mit Maltodextrin als Trägermaterial und Trehalose als Schutzstoff, beträgt die Überlebensrate  $5\%$ . Ähnlich niedrige Überlebensraten werden durch den Einsatz der Zuckerpellets mit Trehalose in Höhe von  $2\%$  und Laktose mit Trehalose in Höhe von  $5\%$  erreicht. Die bioaktiven Granulate weisen bei Verwendung von Maltodextrin und Trehalose nach der Trocknung einen Restwassergehalt von  $4,9 \pm 0,1\%$  auf. Im Falle des Gebrauches von Zuckerpellets und Trehalose beträgt der Restwassergehalt  $0,9 \pm 0,1\%$ . Bei dem Einsatz von Laktose und Trehalose liegt der Restwassergehalt bei  $5,2 \pm 0,1\%$ . Wasseraktivitätswerte liegen für diese Proben nicht vor.

#### 40 Minuten Eindüsung

In Anbetracht der geringen Viabilitäten von *L.plantarum* nach der Granulierung wird die Eindüsenzeit ein weiteres Mal reduziert. In diesem Fall von 60 Minuten auf 40 Minuten. Die Prozessparameter aus Tabelle 5.1 werden auch für diese Versuchsreihe beibehalten. Auf Grund der niedrigen erreichten Viabilitäten bei der Verwendung von Zuckerpellets, wird auf dieses Trägermaterial in den nachfolgenden Experimenten verzichtet. Im Gegenzug findet als neues Trägermaterial ein Maltodextrin-Laktose Gemisch (1:1) für die Trocknung Anwendung. Darüber hinaus bleibt der Zusatz des Zellschutzstoffes Trehalose

erhalten.

In Abbildung 5.9 werden die Viabilitäten von *L.plantarum* vor und nach der Wirbelschichttrocknung unter Verwendung der vorhergehend beschriebenen Trägermaterialien und Schutzstoffe aufgezeigt.



**Abbildung 5.9:** Viabilität von *L.plantarum* vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und dem Maltodextrin-Laktose Gemisch bei einer Eindüsenzeit von 40 Minuten,  $T_{ein} = 40$  °C,  $p_{spr} = 4$  bar,  $\dot{M}_{spr} = 270$  g/h,  $\dot{M}_{L,Laktose} = 75$  kg/h,  $\dot{M}_{L,Malto-Lakto} = 80$  kg/h und  $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85$  kg/h. Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten

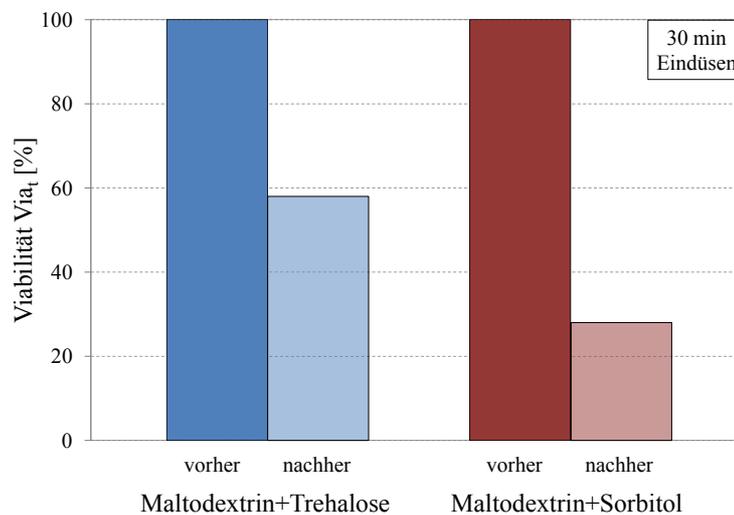
In Abbildung 5.9 ist zu erkennen, dass sich die Viabilität von *L.plantarum* nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin und Trehalose im Vergleich zu den vorher durchgeführten Experimenten um ein Vielfaches steigert. Dabei wird eine Viabilität von 64 % erzielt und der Restwassergehalt der hergestellten bioaktiven Granulate beträgt  $5,1 \pm 0,2\%$ . Die Viabilitäten für die aus Laktose und Trehalose sowie dem Gemisch aus Maltodextrin-Laktose und Trehalose bestehenden *L.plantarum* Granulate weisen ähnlich niedrige Werte wie in den vorangegangenen Experimenten auf. Diese betragen 1 % für Laktose+Trehalose und 2 % für das Gemisch und Trehalose mit den dazugehörigen Restwassergehalten von  $5,1 \pm 0,1\%$  beziehungsweise  $5,0 \pm 0,1\%$ .

### 30 Minuten Eindüsung

Auf Grund der hohen Viabilitäten, die durch den Einsatz von Maltodextrin und dem Zellschutzstoff Trehalose nach der Wirbelschichttrocknung in den vorhergehenden Versuchen erreicht wurden, beschränken sich die anschließenden Experimente auf die Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial. Im Folgenden wird unter Einbehaltung dieser Prämissen und der Prozessparameter aus der Tabelle 5.1 als weiterer Zellschutzstoff Sorbitol getestet.

Davon werden wiederholt 10 g des Schutzstoffes der Bakteriensuspension vor der Trocknung, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, hinzugegeben. Die Eindüsungszeit verkürzt sich ein weiteres Mal, in diesem Fall von 40 auf 30 Minuten.

In Abbildung 5.10 sind die Viabilitäten von *L.plantarum* in Form eines Säulendiagramms vor und nach der Wirbelschichttrocknung unter Einsatz von Maltodextrin und der im Voraus beschriebenen Schutzstoffe, Trehalose und Sorbitol, gegenübergestellt. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich bei jedem Versuch um drei unabhängig voneinander durchgeführte Wirbelschichttrocknungsexperimente. Die Viabilitäten werden durch die vom Mittelwert subtrahierte Standardabweichung angegeben und dargestellt. Um die Vergleichbarkeit mit den noch hinzukommenden Versuchen zu gewährleisten, werden diese Angaben und Darstellungen in den nachfolgenden Experimenten beibehalten.



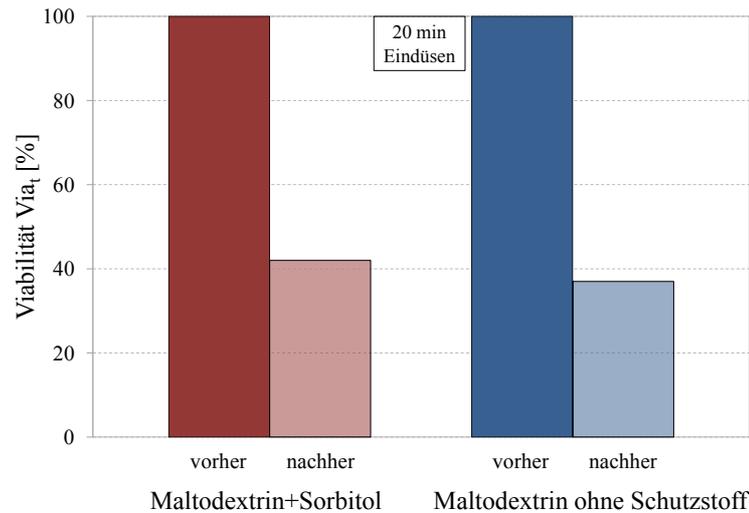
**Abbildung 5.10:** Viabilität von *L.plantarum* vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial und der Zellschutzstoffe Trehalose sowie Sorbitol bei einer Eindüsungszeit von 30 Minuten,  $T_{ein} = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $p_{spr} = 4 \text{ bar}$ ,  $\dot{M}_{spr} = 270 \text{ g/h}$ ,  $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85 \text{ kg/h}$ . Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten ( $n = 3$ )

Aus Abbildung 5.10 wird deutlich, dass nach der Wirbelschichttrocknung unter Einsatz von Maltodextrin sowie der beiden Zellschutzstoffe Trehalose und Sorbitol hohe Viabilitäten von *L.plantarum* erreicht werden. Unter Zuhilfenahme von Maltodextrin und Trehalose werden Viabilitäten in Höhe von 58 % mit einem Restwassergehalt von  $4,5 \pm 0,2 \text{ } \%$  und einer Wasseraktivität von  $0,13 \pm 0,01 \text{ } \%$  erzielt. Hingegen führen die Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol in den Experimenten zu Viabilitäten von 28 %, Restwassergehalten von  $4,8 \pm 0,4 \text{ } \%$  und Wasseraktivitäten von  $0,14 \pm 0,01 \text{ } \%$ .

## 20 Minuten Eindüsung

Bezüglich der hohen Überlebensraten von *L.plantarum*, die in den vorhergehenden Experimenten erreicht wurden, wird in den nachfolgenden Versuchen, unter Einbehaltung der

bisherigen Prozessparametereinstellungen aus Tabelle 5.1 sowie des Schutzstoffes Sorbitol und des Trägermaterials Maltodextrin, die Eindüsungzeit ein weiteres Mal von 30 Minuten auf 20 Minuten reduziert. Zur Untersuchung des Einflusses von Sorbitol als Schutzstoff werden obendrein Versuche durchgeführt, bei denen Maltodextrin weiterhin als Trägermaterial genutzt, jedoch auf die Zugabe des Zellschutzstoffes Sorbitol verzichtet wird. Die Ergebnisse aus den Wirbelschichttrocknungsexperimenten von *L.plantarum* mit den nach der Trocknung erreichten Viabilitäten zeigt die Abbildung 5.11.



**Abbildung 5.11:** Viabilität von *L.plantarum* vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol sowie Maltodextrin ohne Schutzstoff bei einer Eindüsungzeit von 20 min,  $T_{ein} = 40$  °C,  $p_{spr} = 4$  bar,  $\dot{M}_{spr} = 270$  g/h,  $\dot{M}_{Maltodextrin} = 85$  kg/h. Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten (n = 3)

Aus Abbildung 5.11 geht hervor, dass sich bei einer Eindüsungzeit von 20 Minuten ähnlich hohe Überlebensraten nach der Trocknung unabhängig von der Zugabe des Schutzstoffes Sorbitol ergeben. Diese liegen bei der Trocknung von *L.plantarum* unter Zuhilfenahme von Maltodextrin und Sorbitol bei 42 %. Der Restwassergehalt dieser bioaktiven Granulate weist nach der Trocknung einen Wert von  $4,6 \pm 0,3\%$  auf. Die Wasseraktivität beträgt  $0,13 \pm 0,02\%$ . Ohne Zugabe eines Zellschutzstoffes werden nach der Trocknung Überlebensraten von *L.plantarum* in Höhe von 37 % erzielt. Der Restwassergehalt dieser Proben ist  $5,7 \pm 0,2\%$  und die Wasseraktivität beträgt  $0,17 \pm 0,02\%$ .

### 5.2.3 Zusammenfassung der Trocknungsergebnisse

Der Einfluss der Wirbelschichttrocknung auf die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Eindüsungzeit, den verwendeten Trägermaterialien und Schutzstoffen mit den dazugehörigen Wassergehalten und -aktivitäten ist in Tabelle 5.3 dargestellt.

**Tabelle 5.3:** Einfluss der Wirbelschichttrocknung auf die Viabilität, den Wassergehalt und die Wasseraktivität von *L.plantarum*

$t_{eind}$ [min]	n	Trägermaterial	Schutzstoff	$Via_t$ [%]	$X_a$ [%]	$a_w$ [-]
180	1	Maltodextrin	-	1	6,4	0,25
	1	Zuckerpellets	-	0	1,3	n.b.
60	1	Maltodextrin	Trehalose	5	4,9	n.b.
	1	Zuckerpellets	Trehalose	2	0,9	n.b.
	1	Laktose	Trehalose	5	5,2	n.b.
40	1	Maltodextrin	Trehalose	64	5,1	0,20
	1	Laktose	Trehalose	1	5,1	n.b.
	1	Malto/Laktose	Trehalose	2	5,0	n.b.
30	3	Maltodextrin	Trehalose	58	4,5	0,13
	3	Maltodextrin	Sorbitol	28	4,8	0,14
20	3	Maltodextrin	Sorbitol	42	4,6	0,13
	3	Maltodextrin	-	37	5,7	0,17

In der Tabelle 5.3 ist zu erkennen, dass sich mit abnehmenden Eindüsungszeiten die Viabilitäten von *L.plantarum* erhöhen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von anderen Autoren, welche eine kurze Verweilzeit der Bakterien empfehlen. Dieses Erkenntnis kann damit begründet werden, dass die Zellen auf Grund der verkürzten Prozessbedingungen den thermischen, osmotischen, oxidativen und mechanischen Belastungen in der Wirbelschicht in geringerem Maße ausgesetzt sind.

Damit die thermischen Belastungen weitestgehend minimiert werden, wurden die Granulierungen bei niedrigen Temperaturen innerhalb der natürlichen Wachstumsgrenzen von *L.plantarum* durchgeführt. Wie aus der Abbildung 5.4 hervorgeht, liegen die Temperaturen in der Wirbelschicht während des Granulierungs- und Trocknungsprozesses zwischen 28 und 38 °C. Laut Lievense (1991) werden Zellschädigungen, die bei der Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum* bis zu einer Trocknungstemperatur von 50 °C auftreten, nicht auf thermische Beanspruchung sondern viel mehr auf die Dehydrierung zurückgeführt. Somit könnte der Viabilitätsverlust von *L.plantarum* für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wirbelschichttrocknungsexperimente gleichermaßen auf die Dehydrierung bezogen werden. Dabei ist von großem Interesse, in welcher Phase, ob während der Granulierung oder der Nachtrocknung, die Zellschäden am größten sind. Mit dieser Thematik beschäftigten sich unter anderem Bayrock and Ingledew (1997b) in ihrer Arbeit zum Thema Wirbelschichttrocknung von Hefezellen. Sie gewannen die Erkenntnisse, dass bei der Trocknung der Hefen unterhalb von 50 °C die Dehydrierung verantwortlich für den Viabilitätsverlust sei, wobei der größte Verlust im zweiten Trocknungsabschnitt zu verzeichnen war. Diese Beobachtungen können im Falle der hier gewonnenen Ergebnisse nicht ohne Weiteres bestätigt werden. Die Ursache dafür sind die hohen Viabilitätsverluste von *L.plantarum* bei einer Eindüsungszeit von 180 Minuten, einer zehnminütigen Nachtrocknungszeit und der Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial. Im Gegensatz dazu werden bei gleichbleibender Nachtrocknungszeit, Trägermaterial und Prozessbedingungen einzig durch die Verringerung der Eindüsungszeit von 180 auf 20 Minuten deutlich geringere Verluste in den Lebendzellzahlen ermittelt. Daher wird angenommen, dass bei langen

Prozesszeiten Zellmembran- und Proteinschäden bereits während der Granulierung auftreten.

Gründe für Zellmembran- und Proteinschäden könnten Brüche in der Membran sein, die durch zu hohe Trocknungsraten hervorgerufen werden. Proteinschäden entstehen durch den Entzug der Hydrathülle, wodurch sich die Konformation dieser ändert und damit inbegriffen die Funktionalität verloren geht. Weitere Ursachen könnten Scherbeanspruchungen in der Wirbelschicht durch das Zirkulieren der Materialien sein. Dadurch kann es zu Schädigungen der Zellmembran der Bakterien kommen. Die Dauer der Scherbeanspruchung könnte mit dem Viabilitätsverlust bei hohen Verweilzeiten von 180 Minuten erklärt werden.

Vermutlich ändert sich dies ab einer Prozesszeit von 40 Minuten. Bei Verwendung von Maltodextrin und dem Schutzstoff Trehalose werden nach der 40 minütigen Eindüsung deutlich höhere Viabilitäten von 64 %, im Vergleich zu 5 % bei der sechszigminütigen Eindüsung unter Beibehaltung der gleichen Träger- und Schutzstoffe sowie Nachtrocknungszeit erreicht. Diese Erkenntnis trifft jedoch nur auf Maltodextrin zu. Bei Verwendung von Laktose wurden ähnlich niedrige Viabilitäten wie nach der 60 minütigen Eindüsung erreicht. Es ist schwierig dafür Gründe zu finden, da sowohl die Prozesseinstellungen als auch die Wassergehalte der bioaktiven Granulate nach der Trocknung identisch waren. Lediglich der Gasmassenstrom variierte in Abhängigkeit vom Trägermaterial und lag für die Experimente mit Laktose bei  $\dot{M}_{L,Laktose} = 75$  kg/h unterhalb von denen mit Maltodextrin bei  $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85$  kg/h. Dadurch können erhöhte Trocknungsgeschwindigkeiten, die zu Zellschäden führen, ausgeschlossen werden. Da es sich bei den durchgeführten Wirbelschichttrocknungsexperimenten jeweils um eine Einfachbestimmung handelt, könnten Unterschiede der Überlebensraten durch Fehler bei der Bestimmung der Lebendzellzahlen auftreten. Demnach müssten diese Ergebnisse durch Mehrfachbestimmungen evaluiert werden.

Zunächst wurde geschlossen, dass sich durch die verkürzte Prozesszeit und Zugabe des Zellschutzstoffes Trehalose die Überlebensrate von *L.plantarum* verbessert. Die Zugabe von Sorbitol konnte die Erwartung anfänglich bestätigen. Die Verwendung von Schutzstoffen sollte dem Zweck dienen, die Bakterien während der Trocknung zu schützen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wirbelschichttrocknungen mit den beiden unterschiedlichen Schutzstoffen Trehalose und Sorbitol durchgeführt. Auf diese Weise wurde untersucht, welchen Einfluss die jeweiligen Schutzstoffe auf die Überlebensrate von *L.plantarum* haben. Sowohl die gleichen Prozessparameter als auch das gleiche Trägermaterial Maltodextrin wurden verwendet. Die Eindüungszeit betrug 30 Minuten und die Nachtrocknungszeit wiederholt zehn Minuten. In diesen Experimenten konnten hohe Viabilitäten nach der Trocknung erreicht werden. Die Trocknung unter Zuhilfenahme von Trehalose erreichte dabei eine Viabilität von 58 %. Hingegen konnte durch die Zugabe des Schutzstoffes Sorbitol nur eine deutlich geringere Viabilität von 28 % erzielt werden. Demnach scheint Trehalose die Zellen während der Trocknung besser zu schützen. Ein Grund dafür könnte in der besseren Stabilisierung der Zellmembran liegen, da Trehalose während der Trocknung mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipide der Zellmembran interagiert. Sorbitol hingegen wirkt als Antioxidant und verhindert dadurch Lipidoxidationen während der Trocknung. Auf Grund der kurzen Prozesszeiten scheint der oxidative Einfluss keine Schäden nach sich zu ziehen.

Da jedoch parallel zur Zugabe der Schutzstoffe die Eindüsenzeit verringert wurde, konnten nur Vermutungen zum Einfluss der Schutzstoffe gemacht werden. Dies änderte sich durch die letzte Versuchsreihe. In dieser wurden die Ergebnisse aus den Versuchen mit den kürzesten Eindüsenzeiten von 20 Minuten sowie der zehnmütigen Nachrocknungszeit unter Zuhilfenahme von Maltodextrin als Trägermaterial sowie des Zellschutzstoffes Sorbitols und ohne Verwendung eines Zellschutzstoffes miteinander verglichen. Für die Trocknung von *L.plantarum* unter Einsatz von Maltodextrin und Sorbitol wurden Viabilitäten in Höhe von 42 % erzielt, wohingegen bei der Trocknung ohne Verwendung von Sorbitol die Überlebensrate 37 % betrug. Aus diesen Untersuchungen geht somit hervor, dass die Zugabe von Sorbitol keinen zusätzlichen, schützenden Effekt auf die Zellen nach der Trocknung hat, sondern einzig die Reduzierung der Eindüsenzeit verantwortlich für die höheren Überlebensraten ist. Auch andere Forschungsgruppen berichten von ähnlichen Ergebnissen. So wurde gleichermaßen von der Arbeitsgruppe um Carvalho et al. (2002) herausgefunden, dass die Zugabe der Zellschutzstoffe Sorbitol, Inositol, Trehalose und Fruktose vor der Gefriertrocknung von *L.plantarum* keinen Einfluss auf die Überlebensrate nach der Trocknung hat. Dies steht jedoch im Widerspruch zu zahlreichen anderen Arbeiten (Strasser et al., 2009), (Semyonov et al., 2010), (Foerst et al., 2012), welche sowohl Trehalose als auch Sorbitol als wichtige Zusatzkomponenten bei der Trocknung von Milchsäurebakterien erklären.

Wie aus der Tabelle 5.3 zu erkennen ist, werden mit den hier angewandten Prozessbedingungen nach der Wirbelschichttrocknung Wasseraktivitäten zwischen 0,13 und 0,25 erzielt. Damit liegen diese Werte innerhalb des für Lebensmittel empfohlenen Bereichs (Teixeira et al., 1995), (Mille et al., 2004), (Chávez and Ledebor, 2007). Dies gilt im gleichen Maße für die Wassergehalte, welche unterhalb von 5 % liegen sollten. Ausnahmen bilden dabei die bioaktiven Granulate, welche ohne Zugabe eines Schutzstoffes getrocknet wurden. In diesem Fall handelt es sich um jene Experimente, bei denen Maltodextrin als Trägermaterial verwendet wurde und die jeweiligen Eindüsenzeiten 20 und 180 Minuten betragen. Auffällig dabei ist, dass bei diesen Versuchen die Wassergehalte bei vergleichbaren Trocknungsbedingungen weitaus größer als 5 % waren. Der Einfluss der Schutzstoffe wird erst hier deutlich. Es wird angenommen, dass die Ursache für die niedrigeren Wassergehalte in den bioaktiven Granulaten bei den verwendeten Schutzstoffen liegt. Diese besitzen die Fähigkeit, als Wasserersatz zu fungieren und sind in der Lage strukturelle Wassermoleküle in der Zellmembran und den Proteinen zu ersetzen. Dies führt zu einer Verringerung des Wassergehaltes in der Probe, was sich in den hier gewonnenen Ergebnissen widerspiegelt. Die Verringerung des Restwassergehaltes in der Probe könnte somit einen positiven Einfluss auf die Lagerfähigkeit der bioaktiven Granulate haben. Der Zusammenhang zwischen reduziertem Wassergehalt und der Lagerfähigkeit wird im späteren Verlauf der Arbeit dargelegt und diskutiert. Zuvor jedoch werden die simulierten Ergebnisse gezeigt, welche mit Hilfe des Wirbelschichttrocknungs- und Inaktivierungsmodells gewonnen wurden. Diese werden mit den zuvor vorgestellten experimentellen Daten aus der Wirbelschichttrocknung und den erreichten Viabilitäten verglichen.

### 5.3 Vergleich Experiment und Simulation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass verkürzte Eindüsungszeiten bei gleichbleibender Nachtrocknungszeit zu geringeren Zellmembran- und Proteinschäden führen. Somit wird angenommen, dass die während der Eindüsung auftretenden Viabilitätsverluste gering und daher nicht von Bedeutung sind. Bayrock and Ingledew (1997b) bestätigten in ihrer Arbeit diese Annahme. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die Viabilitätsverluste vor allem bei der Nachtrocknung auftreten. Dadurch erfolgt die Simulation der Wirbelschichttrocknung und Inaktivierung der Mikroorganismen ausschließlich für diesen Abschnitt.

Die Validierung des im Kapitel 4 vorgestellten Wirbelschichttrocknungs- und Inaktivierungsmodells wird anhand von experimentell ermittelten Daten vorgenommen. Zur Prüfung werden die Experimente herangezogen, bei denen die Eindüsung der Bakterien auf Maltodextrin unter Zuhilfenahme von Sorbitol 20 Minuten und die Nachtrocknung zehn Minuten erfolgten. Die Simulationsparameter entsprechen den Prozessparametern und sind in der Tabelle 5.4 aufgelistet.

**Tabelle 5.4:** Parameter für die Simulation zur Validierung des Modells anhand der Niedertemperaturgranulierung von *L.plantarum*, <sup>a</sup> Meerdink et al. (1991)

Parameter	Symbol	Maltodextrin+Sorbitol	Einheit
Durchmesser Partikel	$d_p$	$0,27 \cdot 10^{-3}$	[m]
Bettmasse	$m_{bed}$	1	[kg]
Dichte Partikel	$\rho_p$	1530	[kg/m <sup>3</sup> ]
Wärmekapazität Partikel	$c_p$	1500 <sup>a</sup>	[J/kg · K]
Kritische Feuchte Partikel	$X_{kr}$	0,05	[kg/kg]
Gleichgewichtsfeuchte	$X_{Gl}$	0,043	[kg/kg]
Gasmassenstrom	$\dot{M}_L$	85	[kg/h]
Eintrittsbeladung Gas	$Y_{ein}$	0,8	[g/kg]
Eintrittstemperatur Gas	$\vartheta_{ein}$	40	[°C]
Eindüsungsrate Bakteriensuspension	$\dot{M}_{spr}$	270	[g/h]
Temperatur Umgebung	$\vartheta_U$	25	[°C]
Durchmesser der Wirbelschicht	$d_{App}$	0,185	[m]
Masse Apparatewand	$m_{App}$	20	[kg]
Wärmekapazität Wand	$c_W$	450	[J/kg · K]
Diskretisierungsparameter	$q$	50	[-]

Die Werte für die kritische und Gleichgewichtsfeuchte wurden ausgehend von einer Schüttungsmessung im Trockenschrank durch die beiden Werte angepasst. Die Ergebnisse aus der Simulation und der Messung sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Dabei beschränkt sich, wie bereits oben erwähnt, die Simulation auf den zehnminütigen Nachtrocknungsbereich. Dargestellt in den Abbildungen 5.12, 5.13 und 5.14 sind die Verläufe der Temperatur-, Gas- und Produktfeuchte.

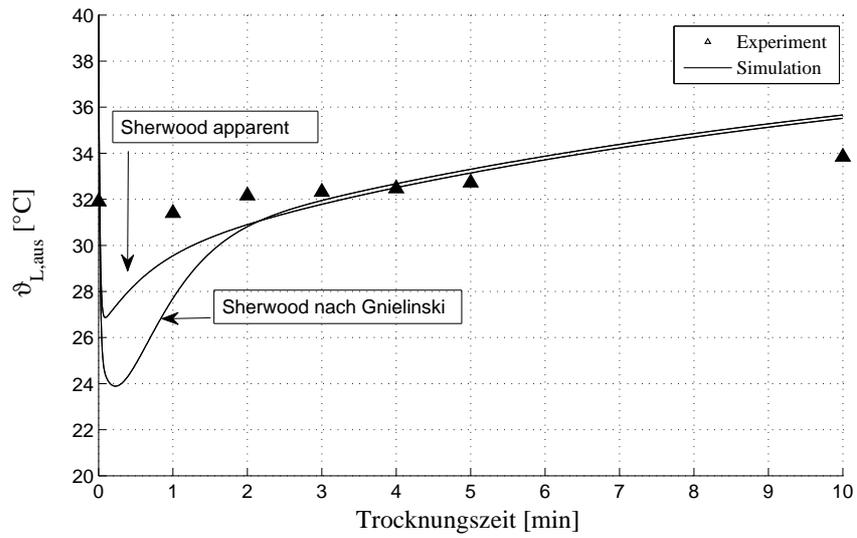


Abbildung 5.12: Darstellung der Simulationsergebnisse des Wärmeübergangs am Beispiel der Trocknung von *L.plantarum* bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol

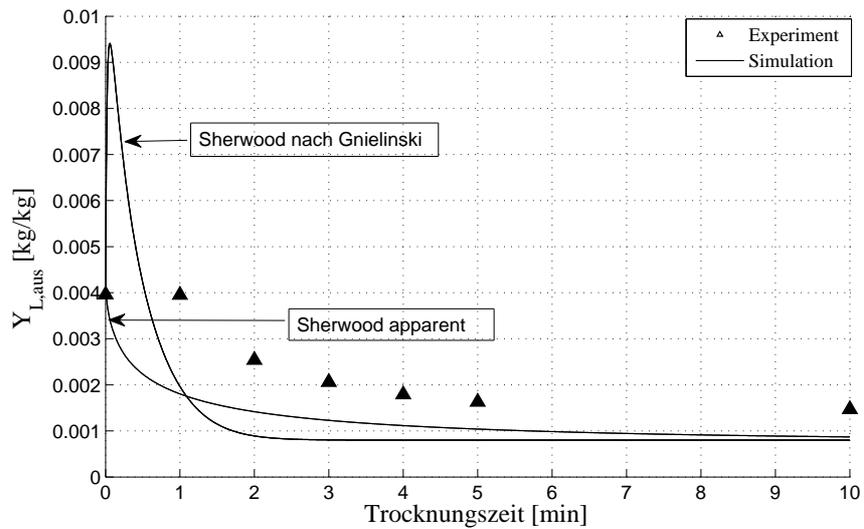
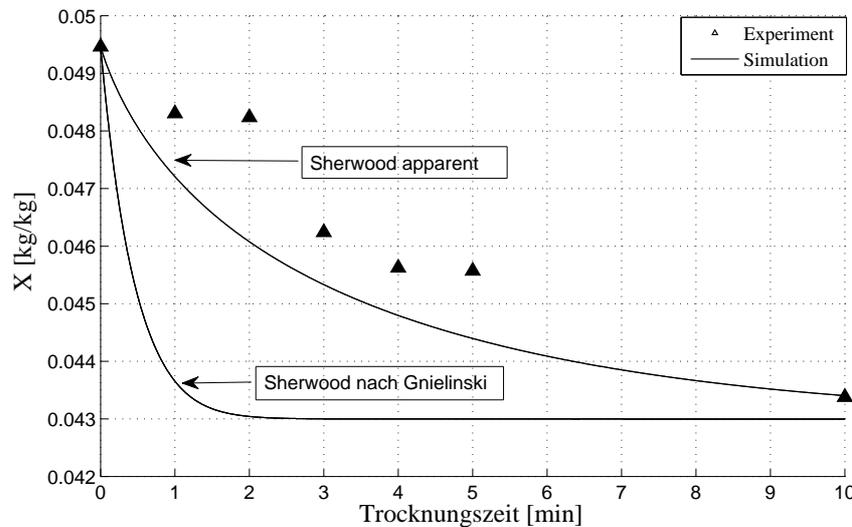


Abbildung 5.13: Darstellung der Simulationsergebnisse des Stoffübergangs am Beispiel der Trocknung von *L.plantarum* bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol



**Abbildung 5.14:** Darstellung der Simulationsergebnisse des Stoffübergangs am Beispiel der Trocknung von *L.plantarum* bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol

In den Abbildungen ist zu erkennen, dass zwei Simulationsergebnisse mit den Messdaten verglichen werden. Der Unterschied in den Simulationsverläufen ergibt sich auf Grund von verschiedenen berechneten Wärme- und Stoffübergangskoeffizienten. Die Koeffizienten wurden mit Hilfe der Sherwood-Zahl nach Gnielinski (1980) bestimmt. In der Berechnung der Sherwood-Zahl gehen die dimensionslosen Kennzahlen Reynold ( $Re$ ) und Schmidt ( $Sc$ ) ein. Dabei wird durch die Reynolds-Zahl das Strömungsverhalten in der Wirbelschicht beschrieben, wohingegen die Schmidt-Zahl eine Kennzahl für die Stoffübertragung (Diffusion) zwischen den Partikeln und der Luft darstellt. Die Beziehungen zueinander sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

Wie aus den oben dargestellten Abbildungen zu erkennen ist, stimmen die Simulationsergebnisse bei Verwendung der Sherwood-Zahl nach Gnielinski (1980) nicht mit den Messergebnissen überein. Der Grund dafür liegt in der ermittelten Sherwood-Zahl, die zu groß kalkuliert wurde. Dadurch ergeben sich größere Wärme- und Stoffübergangskoeffizienten, welche sich in den oben gezeigten Verläufen widerspiegeln. Demzufolge sinkt die Temperatur der Luft während der Eindüsung stärker ab, als es bei den tatsächlichen Messergebnissen der Fall ist. Auf Grund des stärkeren Abfalls wird die Nachtrocknungszeit in den nachfolgenden Simulationsergebnissen bei einer niedrigeren Temperatur in Höhe von  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  begonnen. In diesem Zusammenhang werden die gleichen Beobachtungen für die Gasfeuchte gemacht. Diese liegt deutlich unter denen aus den Messergebnissen. Die Ursache dafür ist erneut auf die zu hoch kalkulierte Sherwood-Zahl zurückzuführen. Darüber hinaus zeichnet sich durch den größeren Stoffübergangskoeffizienten zwischen den Partikeln und der Luft eine schnellere Abnahme der Produktfeuchte ab. Somit ist keine gute Übereinstimmung der Simulations- und Messdaten gegeben. Groenewold and Tsotsas (1997) zeigten, dass sich die Sherwood-Zahl nach Gnielinski (1980) bei hoher Rückvermischung der Luft und großen Reynolds-Zahlen lediglich zur Beschreibung der Wärme- und Stoffübergänge im ersten Trocknungsabschnitt eignet. Jedoch stellte sich heraus, dass sie bei niedrigen Reynolds-Zahlen im zweiten Trocknungsabschnitt nicht anwendbar ist. Dies kann durch das im

Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experiment bestätigt werden. Aus den Berechnungen geht eine Reynolds-Zahl in Höhe von zehn hervor, welche im niedrigen Reynolds-Zahlenbereich angesiedelt ist. Um die Prozesse genauer beschreiben zu können und die Stoff- beziehungsweise Wärmeübergänge auch bei geringen Reynolds-Zahlen zu erfassen, modifizierten Groenewold and Tsotsas (1999) die Sherwood-Zahl von Gnielinski ( $Sh_{Gnie}$ ). Auf diese Weise entstand die scheinbare (apparent) Sherwood-Zahl ( $Sh_{app}$ ), welche ein wichtiger Bestandteil des in dieser Arbeit erstellten Wirbelschichttrocknungsmodells ist. Die scheinbare Sherwood-Zahl wird mit der Gleichung

$$Sh_{app} = \frac{Re_0 Sc}{A_v H} \ln \left( 1 + \frac{A_v H Sh_{Gnie}}{Re_0 Sc} \right) \quad (5.1)$$

ausgedrückt. Dank dieser Erweiterung kann eine kleinere Sherwood-Zahl berechnet werden, wodurch sich die Stoff- und Wärmeübergangskoeffizienten verkleinern. Im Hinblick auf die bisherigen Abweichungen bedeutet das, dass diese dadurch kompensiert werden können und sich die Simulationsergebnisse den Messergebnissen deutlich annähern.

Eine weitere für das Modell wichtige Berechnungsgröße ist die normierte Trocknungskurve. Diese wurde eingangs in dem Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Für die Simulation der Partikelfeuchte im zweiten Trocknungsabschnitt wird auf die Berechnung der normierten Trocknungskurve des Einzelpartikels zurückgegriffen. Der Grund dafür ist die damit verbundene Berücksichtigung aller limitierenden Widerstände im Partikelinneren. Da es sich bei den durchgeführten Experimenten um eine Schüttung und nicht um ein Einzelpartikel handelt, wurden die experimentell ermittelten Trocknungskurven aus der Wirbelschicht, in Anlehnung an die Herangehensweise von Tsotsas (1994) und Groenewold (2004), auf die Trocknungskurven des Einzelpartikels zurückgerechnet. Häufig wird zur Vereinfachung der Berechnung der normierten Trocknungskurve bei der Modellierung von einer monodispersen Schüttung ausgegangen. Jedoch liegt bei der Wirbelschichttrocknung der Mikroorganismen unter Zuhilfenahme des Trägermaterials Maltodextrin keine monodisperse Schüttung vor. Aus diesem Grund wird zusätzlich die von Cunäus et al. (2008) vorgeschlagene Gleichung

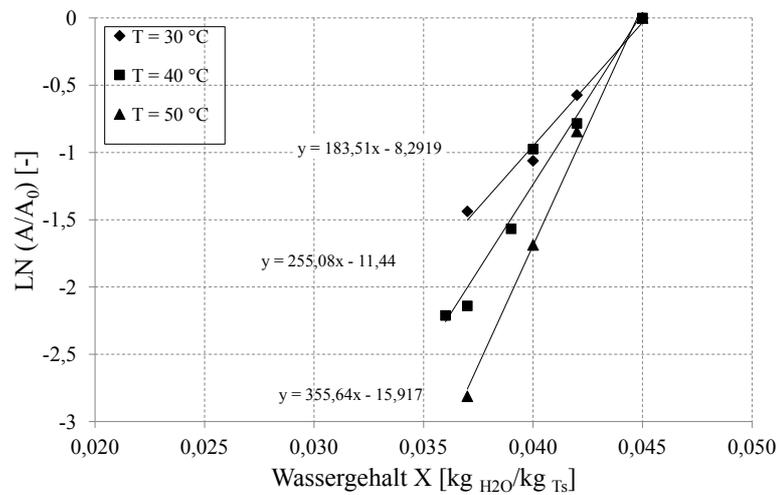
$$\dot{v}(\eta) = \frac{p \cdot \eta}{1 + \eta(p - 1)} \quad (5.2)$$

zur Berücksichtigung einer polydispersen Schüttung für die Formulierung der normierten Trocknungskurve verwendet. Der Parameter  $p$  steht hierbei für den Anpassungsparameter, mit dessen Hilfe die Trocknungskurve der Schüttung auf Werte für eine Trocknungskurve für Einzelpartikel zurückgerechnet werden kann.

In der Abbildung 5.14 ist ersichtlich, dass durch die Verwendung von  $Sh_{app}$  und der Rückrechnung auf die normierte Trocknungskurve der Einzelpartikel, unter Berücksichtigung des Anpassungsparameters  $p = 0,025$ , gute Übereinstimmung zwischen den Mess-

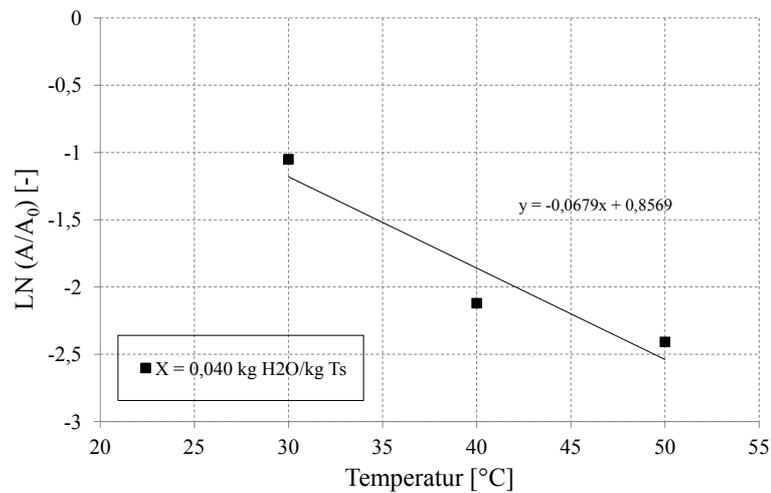
und Simulationsergebnissen vorherrscht. Dadurch konnten die Verläufe der experimentellen Daten erfolgreich mit Hilfe des Wirbelschichttrocknungsmodells abgebildet werden.

Die aus dem Modell gewonnenen Simulationsdaten zum Temperaturverlauf  $dT/dt$  und der zeitlichen Änderung der Partikelfeuchte  $dX/dt$  stehen nun für das Inaktivierungsmodell zur Verfügung. Wie bereits in dem Abschnitt 4.2 beschrieben, müssen zum Einen zur Berechnung der Inaktivierung die Änderung der Lebendzellzahlkonzentration über die Produktfeuchte bei konstanter Temperatur und zum Anderen die Änderung der Lebendzellzahlkonzentration über die Trocknungstemperatur bei konstantem Wassergehalt bestimmt werden. Da das Konstanthalten der Temperatur und Partikelfeuchte in der Wirbelschicht auf Grund von kontinuierlichen Stoff- und Wärmeübergängen nicht zu realisieren ist, wurden Exsikkator- und Trockenschrankversuche durchgeführt. Damit während dieser Versuchsreihe keine unkontrollierten Viabilitätsverluste auftreten, wurden die bioaktiven Granulate zunächst in Exsikkatoren bei 4 °C gelagert, bis sich ein Feuchtegleichgewicht zwischen der Probe und der Umgebung einstellte. Die Vorgehensweise ist detailliert in dem Abschnitt 3.5.5 beschrieben. Zum Einstellen des Feuchtegleichgewichtes wurde das Salz Kaliumacetat verwendet. Dieses wurde bewusst eingesetzt, da der sich in den Granulaten einstellende  $a_w$ -Wert etwa dem des Prozesses in der Wirbelschicht nach der Trocknung entspricht. Nach Erreichen des Gleichgewichtes beträgt der  $a_w$ -Wert in dem Granulat 0,23 und es wurde ein Wassergehalt von 0,045  $g_{H_2O}/g_{T_s}$  gemessen. Im Anschluss erfolgte die Trocknung der Granulate im Trockenschrank bei 30, 40 und 50 °C für zehn Minuten. In regelmäßigen Abständen wurden zeitgleich Proben entnommen, bei denen zum Einen die Lebendzellzahl und zum Anderen der Restwassergehalt bestimmt wurde. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Änderung der Lebendzellzahlkonzentration in Abhängigkeit des durch die Trocknung hervorgerufenen Wasserverlustes werden in der Abbildung 5.15 gezeigt. Dabei wird der natürliche Logarithmus der Lebendzellzahlkonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Trocknung  $A$  auf die Lebendzellzahlkonzentration zu Beginn der Trocknung  $A(0)$  gebildet und dieser über die Produktfeuchte des Granulates dargestellt. Aus den Regressionsgeraden können die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung  $k_X$ , hervorgerufen durch den Wasserverlust, bei den jeweiligen Temperaturen 30, 40 und 50 °C bestimmt werden.



**Abbildung 5.15:** Bestimmung der Inaktivierungskonstanten  $k_X$  aus den Trockenschrankexperimenten

Wie in der Abbildung 5.15 zu erkennen ist, nehmen die Lebendzellzahlen mit kleiner werdendem Wassergehalt ab. Dabei ist eine stärkere Abnahme mit größer werdender Temperatur zu verzeichnen. Die Bestimmung der Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten bei gleichbleibender Produktfeuchte für unterschiedliche Temperaturen erfolgt unter der zuvor erläuterten Herangehensweise. Dazu dient die Darstellung des natürlichen Logarithmus der normierten Lebendzellzahlkonzentration über der Temperatur bei gleichbleibender Partikelfeuchte. Bei der Betrachtung der Abbildung 5.16 ist ersichtlich, dass die Lebendzellzahlen mit steigender Temperatur abnehmen. Die aus diesen Versuchen ermittelten Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten  $k_T$  und  $k_X$  sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.



**Abbildung 5.16:** Bestimmung der Inaktivierungskonstanten  $k_T$  aus den Trockenschrankexperimenten

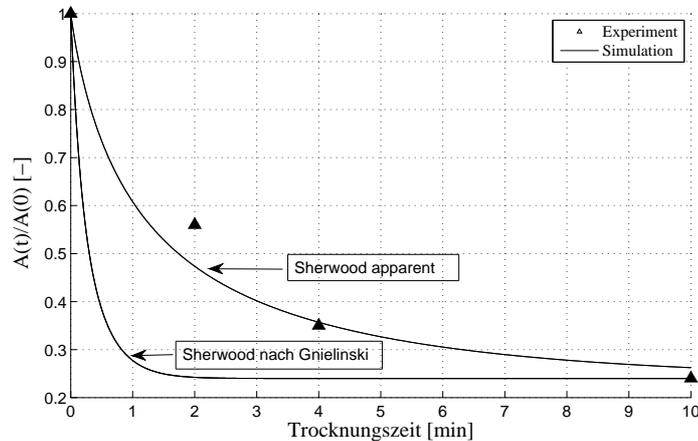
**Tabelle 5.5:** Ermittelte Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten  $k_X$  und  $k_T$

Temperatur T [°C]	Wassergehalt X [ $g_{H2O}/g_{Ts}$ ]	$k_X$ [-]	$k_T$ [1/K]
30	0,045 - 0,037	183,5	-
40	0,045 - 0,036	255,1	-
50	0,045 - 0,037	355,6	-
30-50	0,040	-	-0,0689

Wie aus der Tabelle 5.5 hervorgeht, konnten mit Hilfe der Trockenschrankversuche zum Einen die Inaktivierungskonstanten für die Dehydrierung und zum Anderen jene für die thermische Inaktivierung bestimmt werden. Dabei stellte sich heraus, dass bei einer Trocknungstemperatur bis zu 50 °C die Inaktivierungskonstante bei einem Wassergehalt von  $X = 0,040 g_{H2O}/g_{Ts}$  einen geringen Wert in Höhe von  $k_T = -0,0689$  1/K aufweist. Multipliziert man diesen Wert mit einer Temperaturänderung von beispielsweise 20 K während eines Trocknungsprozesses, so ist das Ergebnis viel kleiner als die mit einer Feuchtegehaltsänderung von, zum Beispiel 0,05 multiplizierten Werte von  $k_X$ , welche bei Temperaturen zwischen 30 und 50 °C zu  $k_X = 183,5$  und  $355,6$  ermittelt wurden. Daher ist ersichtlich, dass die Inaktivierung während der Trocknung nicht auf die thermische Beanspruchung, sondern vielmehr auf die Dehydrierung zurückzuführen ist. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Zimmermann (1987) und Lievens (1991).

Für die Simulation des Viabilitätsverlustes von *L.plantarum* während der Trocknung, wird unter Zuhilfenahme dieser Geschwindigkeitskonstanten und der Gleichung 4.29 die Änderung der Lebendzellzahl über der Zeit berechnet. Dabei werden der  $k_X$ -Wert = 255,1

bei 40 °C und der  $k_T$ -Wert = -0,0689 1/K an das Simulationsprogramm übergeben, da diese den experimentellen Arbeitsbereich am genauesten beschreiben. Die Simulations- und Messergebnisse sind in der Abbildung 5.17 dargestellt.



**Abbildung 5.17:** Mess- und Simulationsergebnisse zur Inaktivierung von *L.plantarum*, granuliert unter Zuhilfenahme von Maltodextrin und Sorbitol, während der anschließenden Trocknung

Wie aus der Abbildung 5.17 hervorgeht, stimmen die Simulationsergebnisse bei Verwendung der scheinbaren Sherwood-Zahl sehr gut mit den Messdaten überein. Somit ist es gelungen, die Wirbelschichttrocknung und die damit verbundene Inaktivierung von *L.plantarum* mit Hilfe eines gekoppelten Wirbelschichttrocknungs- und Inaktivierungsmodells zu erfassen. Der Vergleich der Ergebnisse mit denen von Lievens (1991) ist nicht ohne Weiteres möglich. Der Grund dafür ist die unterschiedliche Herangehensweise bei der Durchführung der Trocknungsversuche. In der Arbeit von Lievens (1991) wurden vor der Trocknung die Bakteriengranulate geformt und als Ganzes in der Wirbelschicht getrocknet. Demnach ist die Verweilzeit der Bakterien in der Anlage gleich. Bei der Herangehensweise der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente werden die Bakterien sukzessiv in die Wirbelschichtanlage eingedüst, wodurch sich unterschiedliche Verweilzeiten ergeben. Ausschließlich in der Nachtrocknungszeit befinden sich alle Bakterien in der Wirbelschicht. Dadurch lässt sich lediglich dieser Zeitraum der Inaktivierung mit dem von Lievens (1991) vergleichen, wobei Schädigungen während der Eindüstung nicht vollends ausgeschlossen werden können. Die Daten von Lievens (1991) werden im Anhang A.4 dieser Arbeit gezeigt.

## 5.4 Einfluss der Lagerung auf die Viabilität

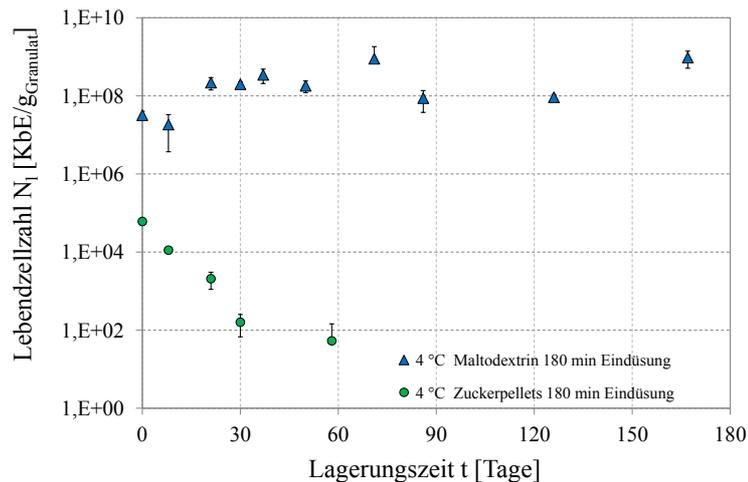
Für die Untersuchung des Einflusses geänderter Prozessparameter, unterschiedlicher Trägermaterialien, Schutzstoffe und Lagerungsbedingungen auf die Zellviabilität sowie Lagerstabilität von *L.plantarum* werden direkt nach der Trocknung alle zuvor hergestellten bioaktiven Granulate in Glasflaschen überführt und geschlossen bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur gelagert. Die Lagerdauer beträgt mindestens sechs Monate. Die Ergebnisse aus

diesen Lagerungsexperimenten werden in den nachfolgenden Abschnitten aufgezeigt. Die Angaben in den Überschriften beziehen sich auf die Versuchsreihen, welche in die jeweiligen Eindüsungszeiten unterteilt sind. Bei der Darstellung der Ergebnisse wird zum Einen der Lebendzellzahlverlauf über den gesamten Lagerungszeitraum in KbE/g Granulat bei Raumtemperatur und 4 °C aufgeführt. Die Angabe KbE/g steht für die koloniebildenden Einheiten von *L.plantarum* je Gramm Granulat. In dieser Darstellung werden die Lebendzellzahlen nach der Trocknung aufgeführt und stellen dabei den Startwert, zum Lagerungszeitpunkt  $t = 0$  Tage, dar. Zum Anderen wird in der zweiten Darstellungsform der natürliche Logarithmus der Lebendzellzahl nach einem bestimmten Lagerungszeitraum bezogen auf jene direkt nach der Trocknung ( $N_l/N_t$ ), unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Lagerungstemperaturen, gebildet. Mit Hilfe von Regressionsgeraden werden die Inaktivierungskonstanten von *L.plantarum* in Abhängigkeit von den oben genannten Einflussgrößen ermittelt.

#### 5.4.1 Einfluss von Trocknungsbedingungen, Lagerungstemperaturen und Umgebungsfeuchten auf die Lagerstabilität

##### 180 Minuten Eindüsung

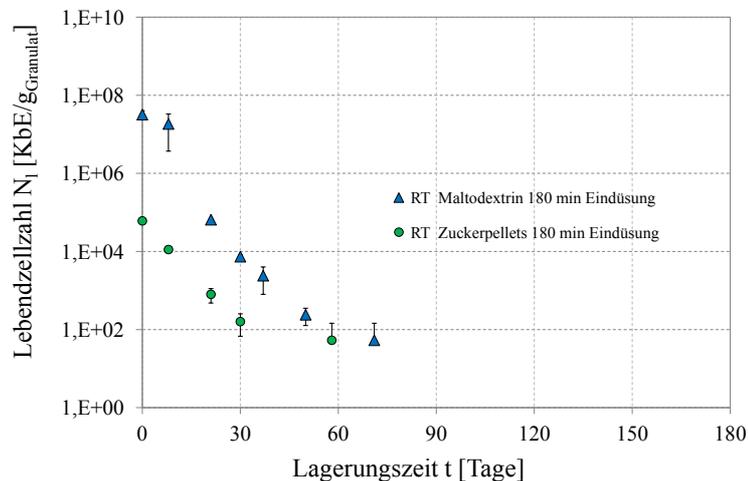
In diesem Lagerungsexperiment werden die Bakterien verwendet, die unter Zuhilfenahme der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets ohne Zugabe eines Schutzstoffes in der Wirbelschicht getrocknet wurden. Die Abbildung 5.18 stellt den Verlauf der Lebendzellzahlen  $N_l$  von *L.plantarum* in KbE/g Granulat bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C dar.



**Abbildung 5.18:** Lebendzellzahlen  $N_l$  von *L.plantarum* in KbE/g Granulat bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C über sechs Monate

Die Abbildung 5.18 zeigt, dass bei einer Lagerungstemperatur von  $4^{\circ}\text{C}$  die Lebendzellzahlen von *L.plantarum* bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial über den gesamten Zeitraum einen konstanten Verlauf aufzeigen, und am Ende der Lagerung die Anzahl der lebenden Zellen ca.  $10^8$  KbE/g beträgt. Der Restwassergehalt der bioaktiven Granulate am Ende der Lagerungszeit ist vergleichbar mit dem Gehalt zu Beginn der Lagerung. Dieser beträgt  $6,3 \pm 0,1$  %. Die Wasseraktivität zu diesem Zeitpunkt weist einen Wert von  $0,27 \pm 0,02$  % auf. Unterschiede ergeben sich im Verlauf der Lebendzellzahlen der getrockneten *L.plantarum* Zellen bei Verwendung des Trägermaterials Zuckerpellets. Von Beginn an sinkt die Lebendzellzahl von  $10^4$  auf  $10^1$  KbE/g Granulat. Nach einer Lagerungszeit von 90 Tagen sind keine lebenden Zellen mehr vorhanden.

Der Einfluss von Raumtemperatur auf die Lagerfähigkeit von *L.plantarum* wird als Verlauf der Lebendzellzahlen über sechs Monate in der Abbildung 5.19 aufgezeigt.



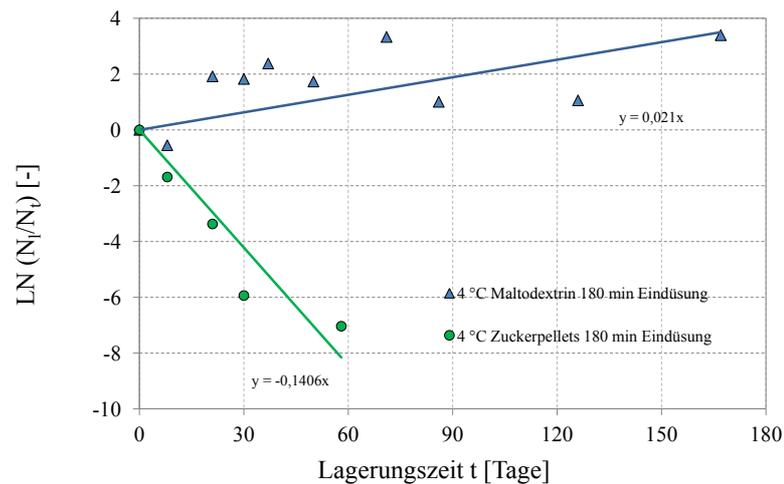
**Abbildung 5.19:** Lebendzellzahlen  $N_i$  in KbE/g Granulat von *L.plantarum* bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets bei der Lagerung bei Raumtemperatur über sechs Monate

Von Beginn an fallen bei beiden Lagerungsexperimenten während des gesamten Zeitraumes, sowohl bei Verwendung des Trägermaterials Maltodextrin als auch unter Nutzung der Zuckerpellets, die Lebendzellzahlen kontinuierlich ab. Im Fall der auf Maltodextrin getrockneten *L.plantarum* Zellen sinkt die Lebendzellzahl von ca.  $10^7$  KbE/g Granulat auf  $10^1$  KbE/g Granulat und erreicht nach 71 Tagen das Minimum. Nach diesem Lagerungszeitraum können keine lebenden Zellen auf den Granulaten ermittelt werden. Der Restwassergehalt der bioaktiven Granulate weist, nach Beendigung der Experimente, nach 90 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur, einen Wert von  $X_e = 6,4 \pm 0,1\%$  auf mit einer Wasseraktivität von  $0,42 \pm 0,2$ .

Bei Betrachtung des Verlaufes der Lebendzellzahlen bei Verwendung des Trägermaterials

Zuckerpellets ist zu erkennen, dass dieser dem vorher beschriebenen ähnelt. Dieser unterscheidet sich jedoch zum Vorhergehenden durch niedrigere Lebendzellzahlen. Die Lebendzellzahlen fallen stärker ab. Nach 58 Tagen Lagerung konnten letztmalig lebende Zellen auf den Granulaten gefunden werden. Nach dieser Zeit wird ein Restwassergehalt der bioaktiven Granulate von  $X_e = 1,8 \pm 0,1\%$  ermittelt. Wasseraktivitätswerte für diese Proben liegen nicht vor.

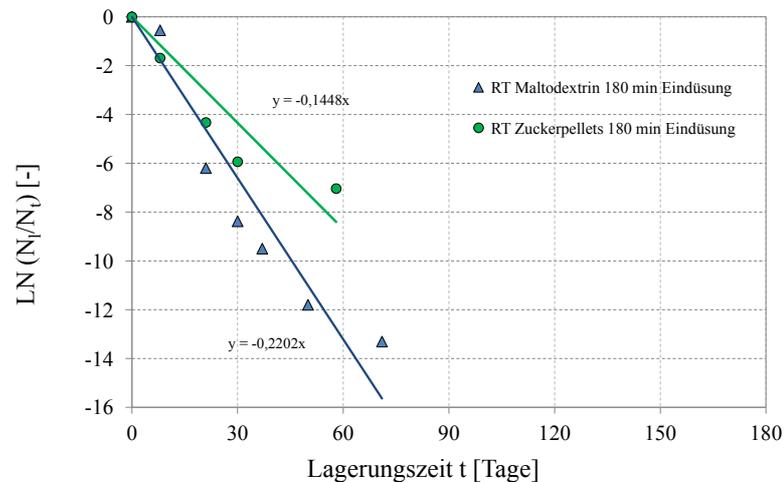
Eine zweite Möglichkeit, die Lagerstabilität getrockneter bioaktiver Granulate zu beschreiben, wird durch die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_l$  realisiert. Diese steht für die Inaktivierungsgeschwindigkeit während der Lagerung, wie bereits im Abschnitt 3.5.5 erläutert. Die Geschwindigkeitskonstante wird durch lineare Regression der Lebendzellzahlen aus je einem Lagerungsexperiment für die jeweiligen Lagerungstemperaturen, 4°C und Raumtemperatur, über einen Zeitraum von sechs Monaten ermittelt. Die Abbildung 5.20 zeigt den Verlauf der Geschwindigkeitskonstanten der jeweils unter Zuhilfenahme von Maltodextrin und Zuckerpellets getrockneten *L.plantarum* Zellen bei einer Lagerung von 4 °C.



**Abbildung 5.20:** Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen  $N_t$  von *L.plantarum* während der Lagerung, bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_i$  nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets bei einer Temperatur von 4 °C über sechs Monate

In der Abbildung 5.20 ist zu erkennen, dass die auf Maltodextrin getrockneten *L.plantarum* Bakterien bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C keinen signifikanten Viabilitätsverlust über den gesamten Lagerungszeitraum aufweisen. Es ist eher eine geringe Aktivitätszunahme zu verzeichnen, woraus sich für die Inaktivierungskonstante ein kleiner negativer Wert in Höhe von  $k_l \text{ Maltodextrin} = -0,021 \text{ Tage}^{-1}$  ergibt. Hingegen fällt bei den auf Zuckerpellets getrockneten Zellen der natürliche Logarithmus der Lebendzellzahlkonzentrationen gleichmäßig ab. Nach 58 Tagen Lagerung wird das Minimum der Lebendzellzahl erreicht.

Die Inaktivierungskonstante für diesen Zeitraum beträgt  $k_l \text{ Zuckerpellets} = 0,141 \text{ Tage}^{-1}$ . Demnach steigt die Inaktivierungsgeschwindigkeit bei Verwendung der Zuckerpellets im Vergleich zu Maltodextrin. Ein Grund dafür könnte in dem Wassergehalt der Zuckerpellets liegen. Dieser liegt weitaus unter dem der Maltodextrin Granulate. Daher wird angenommen, dass die Zellmembran während der Trocknung auf Grund des größeren Wasserverlustes stärker beschädigt wurde. Inwieweit sich die Inaktivierungsgeschwindigkeit im Falle der Lagerung bei Raumtemperatur und der vorhergenannten Trägermaterialien verändert, ist in Abbildung 5.21 dargestellt.



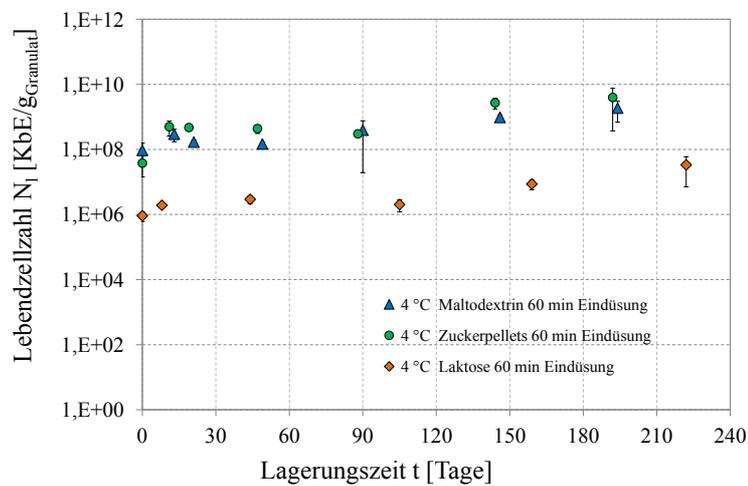
**Abbildung 5.21:** Logarithmus der Lebendzellzahlen  $N_t$  von *L.plantarum* während der Lagerung, bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_0$  nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin und Zuckerpellets bei Raumtemperatur über sechs Monate

Die Verläufe der Lebendzellzahlen bei Verwendung von Maltodextrin und Zuckerpellets in Abbildung 5.21 ähneln sich. Die Lagerung bei Raumtemperatur äußert sich in einem kontinuierlichen Viabilitätsverlust über den gesamten Lagerungszeitraum unabhängig vom verwendeten Trägermaterial. Durch den Einsatz von Zuckerpellets ist *L.plantarum* bei Raumtemperatur maximal 58 Tage lagerfähig, unter Nutzung von Maltodextrin maximal 71 Tage. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit der auf Maltodextrin getrockneten Zellen steigt im Vergleich zur Lagerung bei 4 °C von  $-0,021 \text{ Tage}^{-1}$  auf  $k_l \text{ Maltodextrin} = 0,220 \text{ Tage}^{-1}$ . Unter Verwendung von Zuckerpellets werden ähnlich hohe Werte wie im Falle der Lagerungsexperimenten bei 4 °C in Höhe von  $k_l \text{ Zuckerpellets} = 0,145 \text{ Tage}^{-1}$  erreicht. Die Ursache für den großen Viabilitätsverlust bei Verwendung von Maltodextrin liegt in den hohen Wassergehalts- und -aktivitätswerten. Diese führen zu Phasen- und Zustandsänderungen der Zellen, die mit Änderungen der molekularen Mobilität einhergehen. Dadurch laufen physikalische Reaktionen wieder ab und nichtenzymatische Bräunungsreaktionen nehmen zu. Diese führen zu Abbaureaktionen in den Zellen und die Lebendzellzahlkonzentration nimmt stetig ab. Im Hinblick darauf beobachteten Roos and Karel (1991b) einen exponentiellen Zusammenhang zwischen abnehmender Viskosität und zunehmender molekularen

Mobilität. Dieser findet sich in den Abbildungen 5.19 und 5.21 in Form der Abnahme der Lebendzellzahlen wieder.

### 60 Minuten Eindüsung

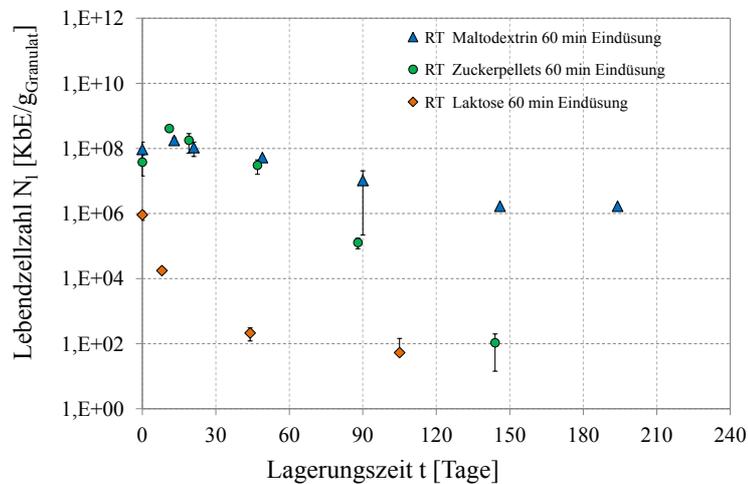
Für die Untersuchung der Lagerstabilität von *L.plantarum* werden die erzeugten Granulate wieder bei 4 °C und Raumtemperatur gelagert und die Lebendzellzahlen über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten bestimmt. Bei den Granulaten handelt es sich um Maltodextrin-, Zuckerpellet- und Laktose-Granulate, die zusätzlich Trehalose als Zellschutzstoff enthalten. Die Ergebnisse aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C sind in der Abbildung 5.22 zusammengefasst. Der Verlauf der Lebendzellzahlen  $N_l$  in KbE/g Granulat von *L.plantarum* ist über den gesamten Lagerungszeitraum dargestellt.



**Abbildung 5.22:** Lebendzellzahl  $N_l$  in KbE/g Granulat von *L.plantarum* bei Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets und Laktose bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C über eine Lagerungszeit von mindestens sechs Monaten

Während der Lagerung von *L.plantarum* bei 4 °C ähnelt sich der Verlauf der Lebendzellzahlen unabhängig vom verwendeten Trägermaterial. Dieser ist über den gesamten Lagerungszeitraum konstant. Am Ende der Lagerungszeit erreichen die aus Maltodextrin bestehenden Granulate Wassergehalte in Höhe von  $X_e = 4,9 \pm 0,1\%$  und die Zuckerpellet-Granulate  $X_e = 1,0 \pm 0,1\%$ . Für die Laktose-Granulate liegen keine Werte vor.

Der Einfluss von höheren Temperaturen bei Vorhandensein des Zellschutzstoffes Trehalose auf die Viabilität sowie die Lagerstabilität wird in der Abbildung 5.23 aufgezeigt.

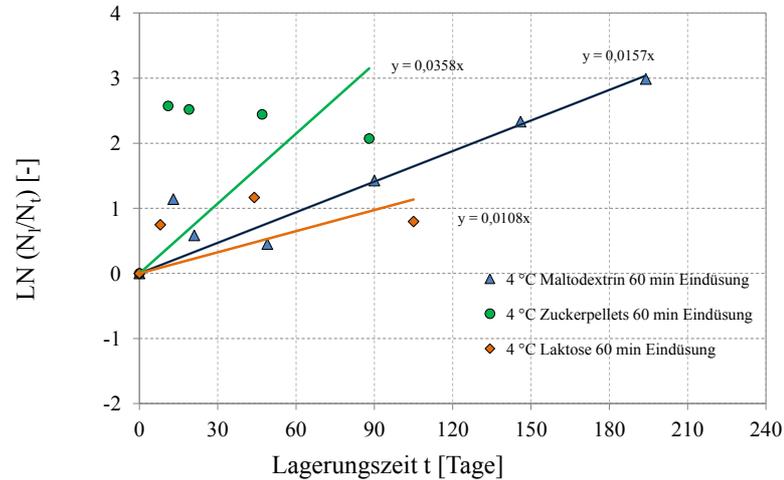


**Abbildung 5.23:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Verlauf der Lebendzellzahlen  $N_l$  in KbE/g Granulat von *L. plantarum* unter Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets und Laktose

Die Lagerung bei Raumtemperatur verändert die Verläufe der Lebendzellzahlen. Mit zunehmender Zeit sinken die Lebendzellzahlen, wobei der stärkste Abfall bei Verwendung von Laktose erreicht wird. Nach drei Monaten Lagerung weisen die bioaktiven Laktose-Granulate eine Lebendzellzahl von  $10^1$  KbE/g auf, die im weiteren Verlauf auf null absinkt. Die Ursache dafür könnten hohe Wassergehalte der Granulate sein. Der Wasserentzug während der Trocknung von Laktose führt zur Bildung von amorphen Strukturen. Diese bestehen aus  $\alpha$ -Laktose sowie  $\beta$ -Laktose und sind stark hygroskopisch. Durch die bei der Lagerung auftretende Adsorption von Feuchtigkeit, welche bei Öffnung der Glasflaschen zur Probenentnahme stattfinden kann, geht die amorphe Laktose in  $\alpha$ -Hydrat über und es kommt zu Verklumpungen von Laktose und Proteinen. Dadurch verschlechtern sich die Produkteigenschaften und es kann kein rieselfähiges Produkt erzeugt werden. Zudem wirkt sich die hohe Hygroskopizität infolge der Wassergehaltszunahme negativ auf die Stabilität der Zellen aus. Wiederholt wird hier eine exponentielle Abnahme der Lebendzellzahlen beobachtet, welche wiederum auf erhöhte molekulare Mobilitäten und geringere Viskositäten hindeutet. Durch die Verwendung des Trägermaterials Zuckerpellets verlängert sich die Lagerfähigkeit von *L. plantarum* um einen Monat. Diese Granulate weisen einen Restwassergehalt von  $X_e = 1,1 \pm 0,1\%$  auf. In Anbetracht des niedrigen Wassergehaltes wird vermutet, dass wiederholt große Schäden durch den Entzug des Wassers der Zellen auftreten. Die höchste Lebendzellzahl wird bei Verwendung des Trägers Maltodextrin unter Zuhilfenahme von Trehalose erreicht. Hierbei sinkt die Lebendzellzahl zwar kontinuierlich ab, sie weist aber am Ende des Experimentes dennoch einen recht hohen Wert von  $10^6$  KbE/g Granulat auf. Der Restwassergehalt der Granulate erreicht einen Wert von  $X_e = 4,8 \pm 0,1\%$ . Dieser liegt im Stabilitätsbereich von 5 %.

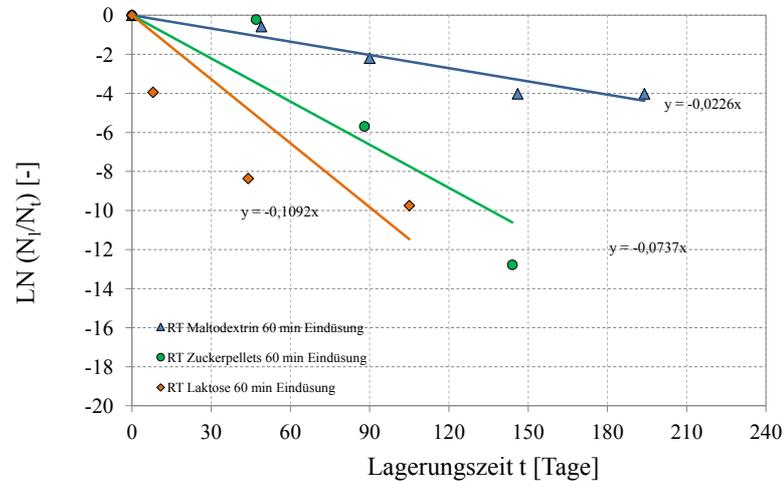
Die Abbildung 5.24 spiegelt den natürlichen Logarithmus der Lebendzellzahlen  $N_l$  während

der Lagerung bezogen auf die Lebendzellzahl nach der Trocknung  $N_t$  bei 4 °C wider. In dieser Darstellung wird durch lineare Regression der Messdaten der Verlust der Viabilität durch die Inaktivierungskonstante  $k_l$  beschrieben. Als Trägermaterialien dienen, wie in den vorhergehenden Experimenten, Maltodextrin, Zuckerpellets und Laktose sowie der Zellschutzstoff Trehalose.



**Abbildung 5.24:** Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* während der Lagerung  $N_t$  [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_i$  [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets, Laktose sowie des Schutzstoffes Trehalose

Aus der Abbildung 5.24 geht hervor, dass durch die Wahl des verwendeten Trägermaterials sowie des Zellschutzstoffes keine deutlich erkennbaren Abweichungen in Bezug auf den Anstieg bei Verwendung von Maltodextrin und Laktose vorhanden sind. Dies unterscheidet sich zu dem Verlauf der Lebendzellzahlen bei Verwendung von Zuckerpellets, bei dem der Anstieg größer ist. Es ergeben sich Inaktivierungskonstanten für *L.plantarum* unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Trägermaterialien von  $k_l \text{ Maltodextrin} = -0,016 \text{ Tage}^{-1}$ ,  $k_l \text{ Zuckerpellets} = -0,036 \text{ Tage}^{-1}$  und  $k_l \text{ Laktose} = -0,011 \text{ Tage}^{-1}$ . Der Einfluss höherer Temperaturen auf die Lagerstabilität von *L.plantarum* ist in der Abbildung 5.23 dargestellt und wird wiederholt durch den natürlichen Logarithmus der Lebendzellzahlen ausgedrückt.

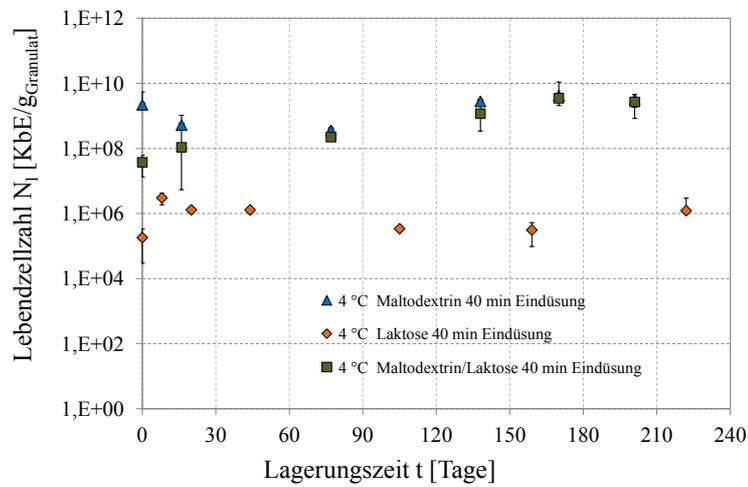


**Abbildung 5.25:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* während der Lagerung  $N_t$  [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_i$  [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Zuckerpellets, Laktose sowie des Schutzstoffes Trehalose

Die Lagerung bei Raumtemperatur bewirkt nach Abbildung 5.25 einen Abfall des natürlichen Logarithmus der Lebendzellzahlen über den gesamten Zeitraum. Dies unterscheidet sich zu dem zuvor ermittelten Verlauf bei 4 °C. Der stärkste Abfall wird bei Verwendung des Trägermaterials Laktose erreicht. Die Lagerfähigkeit von *L.plantarum* ist in diesem Fall am kürzesten und beschränkt sich auf etwa fünf Monate. Aus der Regressionsgeraden ergibt sich die Inaktivierungskonstante  $k_l \text{ Laktose} = 0,109 \text{ Tage}^{-1}$ . Bei Verwendung des Trägers Zuckerpellets zeigt sich ein ähnlicher Verlauf. Die Lagerfähigkeit von *L.plantarum* endet hier nach etwa sechs Monaten und die Inaktivierungskonstante ist  $k_l \text{ Zuckerpellets} = 0,074 \text{ Tage}^{-1}$ . Die höchsten Lebendzellzahlen über den gesamten Zeitraum ergeben sich durch die Verwendung von Maltodextrin und Trehalose. Diese sinken während der Lagerung mit einer deutlich geringeren Geschwindigkeitskonstanten von  $k_l \text{ Maltodextrin} = 0,023 \text{ Tage}^{-1}$ . Die Bakterien sind dadurch mindestens sechs Monate lagerfähig.

#### 40 Minuten Eindüsung

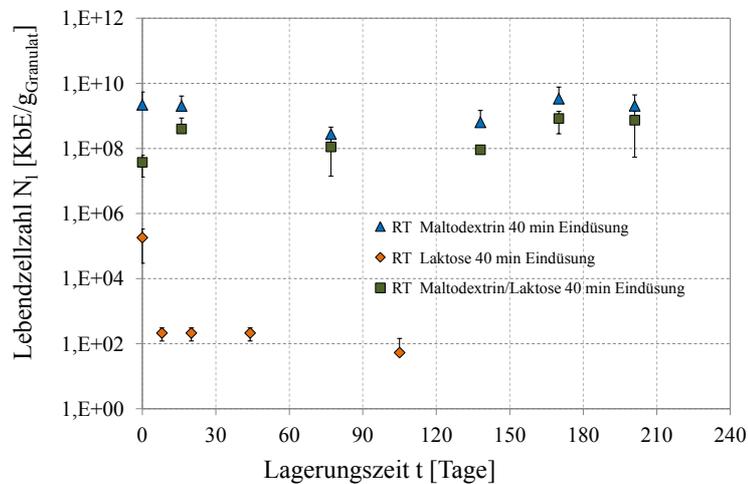
Zur Überprüfung der Lagerfähigkeit werden die hergestellten Granulate erneut bei 4 °C und bei Raumtemperatur gelagert um die Lebendzellzahlen über eine Lagerdauer von mindestens sechs Monaten zu bestimmen. Bei den bioaktiven Granulaten handelt es sich um die Trägerstoffe Maltodextrin, Laktose und dem Gemisch aus Maltodextrin und Laktose sowie dem Schutzstoff Trehalose. Die Ergebnisse aus diesen Lagerungsexperimenten sind in der Abbildung 5.26 visualisiert.



**Abbildung 5.26:** Lebendzellzahl  $N_l$  in KbE/g Granulat von *L.plantarum* bei Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und dem Maltodextrin-Laktose Gemisch bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C über eine Lagerungszeit von mindestens sechs Monaten

Unabhängig vom verwendeten Trägermaterial wird über die gesamte Lagerdauer ein ähnlich konstanter Verlauf der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* erreicht. Die Granulate weisen am Ende des Lagerungsexperimentes bei Verwendung von Laktose als Träger einen Restwassergehalt von  $X_e = 5,1 \pm 0,1\%$ , unter Nutzung von Maltodextrin einen Restwassergehalt von  $X_e = 5,1 \pm 0,2\%$  und bei dem Einsatz des Maltodextrin-Laktose Gemisches liegt der Restwassergehalt bei  $X_e = 5,0 \pm 0,1\%$ . Die Wasseraktivitätswerte liegen einzig für die Maltodextrin-Granulate vor und betragen  $a_w = 0,19 \pm 0,02 \%$ .

In Abbildung 5.27 werden die Ergebnisse der Lagerungsexperimente bei Raumtemperatur dargelegt.



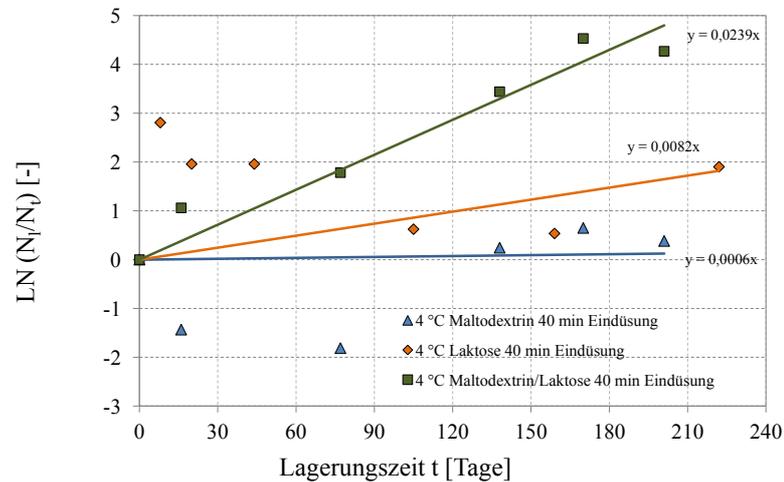
**Abbildung 5.27:** Lebendzellzahl  $N_l$  in KbE/g Granulat von *L.plantarum* bei Verwendung des Zellschutzstoffes Trehalose und der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und dem Maltodextrin-Laktose Gemisch bei Raumtemperatur über eine Lagerungszeit von mindestens sechs Monaten

Aus der Abbildung 5.27 geht hervor, dass sich durch die Lagerung bei Raumtemperatur der Verlauf der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* in Abhängigkeit vom verwendeten Trägermaterial erheblich unterscheidet. Mit zunehmender Lagerdauer sinkt die Lebendzellzahl durch den Einsatz des Trägermaterials Laktose. Nach einer einwöchigen Lagerungszeit verringert sich diese auf  $10^2$  KbE/g, bis schließlich nach vier Monaten Lagerung keine lebenden Zellen mehr vorhanden sind. Zu diesem Zeitpunkt beträgt der Restwassergehalt  $X_e = 5,0 \pm 0,1\%$ . Auf Basis des hier ermittelten Wassergehaltes kann die vorangehend getroffene Annahme, bezüglich des hohen Wassergehaltes infolge der hohen Hygroskopizität von Laktose, nicht bestätigt werden. Vielmehr könnten noch ablaufende Stoffwechselprozesse für den Verlust verantwortlich sein, da es sich bei dem Träger Laktose um ein ideales Substrat für Milchsäurebakterien handelt.

Unter Zuhilfenahme von Maltodextrin und dem Gemisch sind Parallelen in den Verläufen der Lebendzellzahlen erkennbar. Diese sind über den gesamten Zeitraum konstant und weisen nach einer Lagerung von sechs Monaten Lebendzellzahlen in Höhe von ca.  $10^8$  KbE/g bei Verwendung des Maltodextrin-Laktose Gemisches und ca.  $10^9$  KbE/g bei Maltodextrin auf. Die Restwassergehalte erreichen hier Werte für das Gemisch von  $X_e = 5,1 \pm 0,1\%$  und für Maltodextrin  $X_e = 5,9 \pm 0,2\%$ . Wasseraktivitätswerte existieren ausschließlich für die aus Maltodextrin bestehenden bioaktiven Granulate. Diese besitzen nach Beendigung der Lagerungsexperimente eine Wasseraktivität von  $a_w = 0,41 \pm 0,01\%$ . Trotz hoher Wassergehalts- und -aktivitätswerte weisen die Kulturen nur geringe Verluste der Lebendzellzahlen auf. Dies soll in dem Abschnitt 5.4.3 näher diskutiert werden.

In der Abbildung 5.28 ist der natürliche Logarithmus der Lebendzellzahlen  $N_l$  während

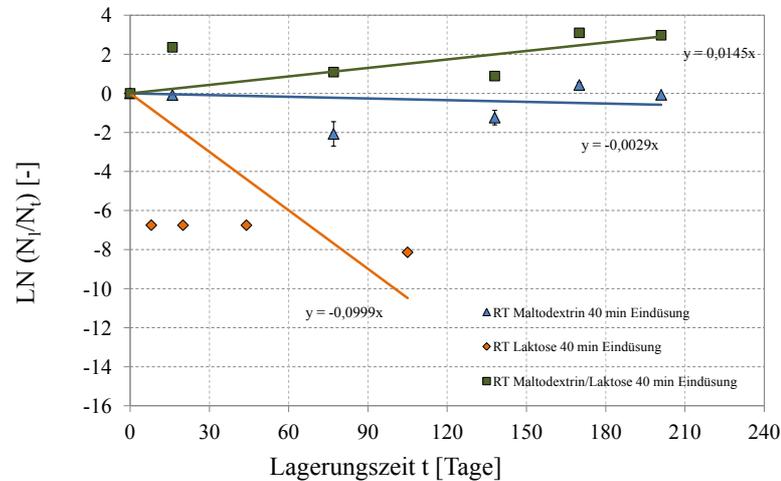
der Lagerung bezogen auf die Lebendzellzahl nach der Trocknung  $N_t$  bei 4 °C und die dazugehörigen Regressionsgeraden dargestellt.



**Abbildung 5.28:** Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* während der Lagerung  $N_t$  [KbE/g] bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_i$  [KbE/g] nach der Trocknung bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und einem Maltodextrin-Laktose Gemisch sowie des Schutzstoffes Trehalose

Der Verlauf der Graphen in der Abbildung 5.28 deutet darauf hin, dass die Lebendzellzahlen von *L.plantarum* über den gesamten Lagerungszeitraum bei Verwendung von Maltodextrin oder Laktose konstant verlaufen. Der positive Anstieg der Regressionsgeraden bei den Lagerungsexperimenten unter Zuhilfenahme des Gemisches bestehend aus Maltodextrin und Laktose könnte auf Messfehler bei der Bestimmung der Lebendzellzahlen zurückzuführen sein. Die Inaktivierungskonstanten für *L.plantarum* erreichen Werte in Höhe von  $k_l \text{ Maltodextrin} = -0,001 \text{ Tage}^{-1}$ ,  $k_l \text{ Malto-LaktoGemisch} = -0,024 \text{ Tage}^{-1}$  und für  $k_l \text{ Laktose} = -0,008 \text{ Tage}^{-1}$ .

Aus der nachfolgenden Darstellung von Abbildung 5.29 lässt sich ableiten, inwieweit sich eine Erhöhung der Lagertemperatur auf die Lebendzellzahlen in Abhängigkeit von der Zugabe des Zellschutzstoffes Trehalose sowie der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und dem Malto-dextrin-Laktose Gemisch auswirken.

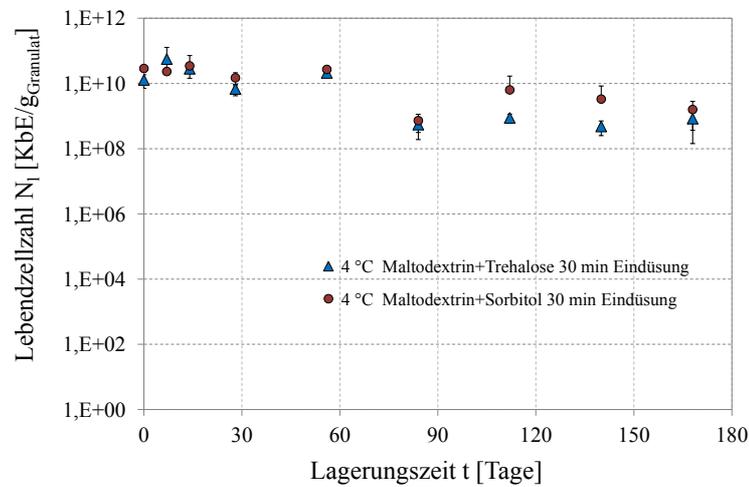


**Abbildung 5.29:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* während der Lagerung  $N_t$  [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_0$  [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin, Laktose und einem Maltodextrin-Laktose Gemisch sowie des Schutzstoffes Trehalose

In der Abbildung 5.29 wird ersichtlich, dass die Anzahl der lebenden Zellen bei Einsatz von Laktose als Trägermaterial deutlich abnimmt. Nach einem Zeitraum von fünf Monaten erreicht sie den Wert null. Im Gegensatz dazu entwickeln sich die Verläufe unter Verwendung von Maltodextrin bzw. dem Maltodextrin-Laktose Gemisch konstant ohne nennenswerten Abfall der Lebendzellzahlen über den gesamten Lagerungszeitraum. Als Ergebnis aus den Regressionsgeraden werden Inaktivierungskonstanten von  $k_l \text{ Maltodextrin} = 0,003 \text{ Tage}^{-1}$ ,  $k_l \text{ Laktose} = 0,100 \text{ Tage}^{-1}$  und  $k_l \text{ Malto-LaktoGemisch} = -0,015 \text{ Tage}^{-1}$  erreicht.

### 30 Minuten Eindüsung

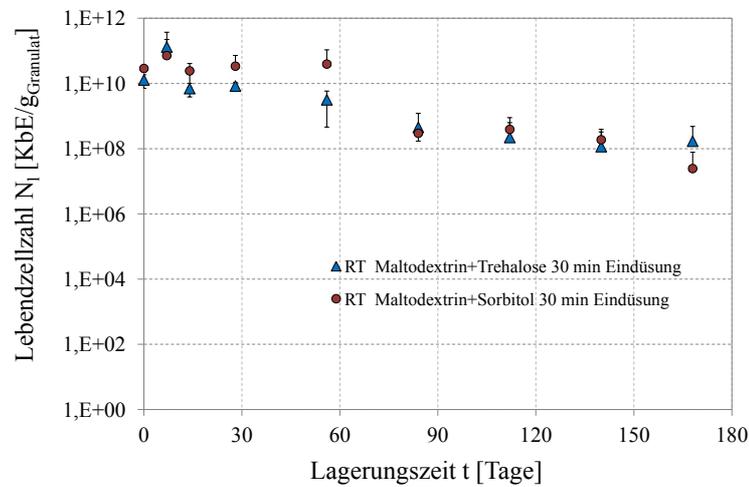
Die hergestellten bioaktiven Granulate, bestehend aus Maltodextrin sowie den Zellschutzstoffen Sorbitol beziehungsweise Trehalose, werden erneut bei 4 °C und Raumtemperatur über eine Dauer von sechs Monaten gelagert. Am Ende des Experimentes werden der Restwassergehalt sowie die Wasseraktivität bestimmt. Die Verläufe der Lebendzellzahlen aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C sind in der Abbildung 5.30 dargelegt.



**Abbildung 5.30:** Lebendzellzahl  $N_l$  in KbE/g Granulat von *L.plantarum* bei Verwendung der Zellschutzstoffe Trehalose und Sorbitol sowie des Trägermaterials Maltodextrin bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C über eine Zeit von sechs Monaten

In diesem Versuch ziehen die verwendeten Zellschutzstoffe keine erheblichen Unterschiede bezogen auf den Verlauf der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* nach sich. Somit ergeben sich unabhängig vom verwendeten Zellschutzstoff konstante Verläufe über den Zeitraum von 168 Tagen. Die Lebendzellzahlen zu Beginn des Experimentes betragen  $10^{10}$  KbE/g Granulat und sinken gleichermaßen bis zu einem Wert von  $10^9$  KbE/g Granulat ab. Am Ende des Experimentes weisen der Restwassergehalt und die Wasseraktivität der bioaktiven Granulate keine Unterschiede zu den Ausgangswerten auf.

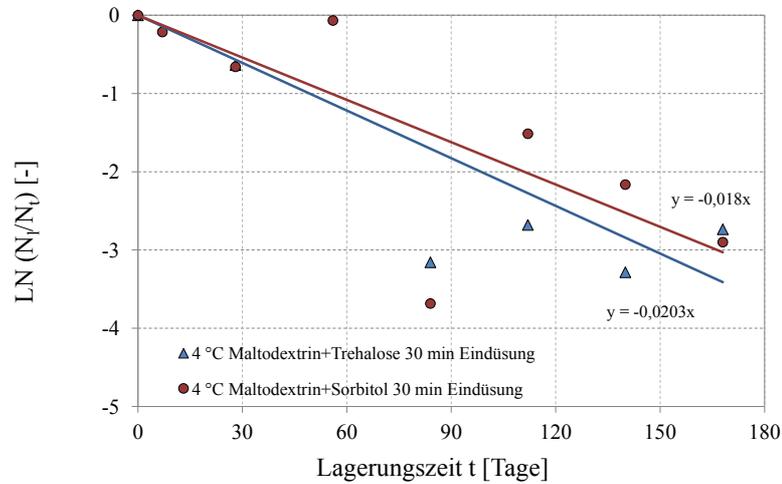
Der Einfluss höherer Temperaturen auf die Lebendzellzahlen während der Lagerung bei Verwendung der unterschiedlichen Zellschutzstoffe ist in der Abbildung 5.31 dargestellt.



**Abbildung 5.31:** Lebendzellzahl  $N_l$  in KbE/g Granulat von *L.plantarum* bei Verwendung der Zellschutzstoffe Trehalose und Sorbitol sowie des Trägermaterials Maltodextrin bei der Lagerung bei Raumtemperatur über eine Zeit von sechs Monaten

In der Abbildung 5.31 wird ersichtlich, dass sich die Verläufe der Lebendzellzahlen der Bakterien unabhängig vom Schutzstoff bei Raumtemperatur über die gesamte Lagerdauer ähneln. Zu Beginn der Lagerung beträgt die Anzahl der lebenden Zellen ca.  $10^{10}$  KbE/g Granulat. Nach einer Zeitspanne von drei Monaten reduziert sich diese auf ca.  $10^8$  KbE/g Granulat und bleibt bis zum Ende des Versuches unverändert. Der Restwassergehalt und die Wasseraktivität nach Beendigung der Lagerungsexperimente erreichen für die bioaktiven Granulate, bestehend aus Maltodextrin und Trehalose, Werte in Höhe von  $X_e = 5,3 \pm 1,0\%$  bzw.  $a_w = 0,18 \pm 0,01 \%$ . Im Fall der bioaktiven Granulate aus Maltodextrin und Sorbitol beläuft sich der Restwassergehalt auf  $X_e = 6,1 \pm 0,8\%$  und die Wasseraktivität auf  $a_w = 0,27 \pm 0,12 \%$ .

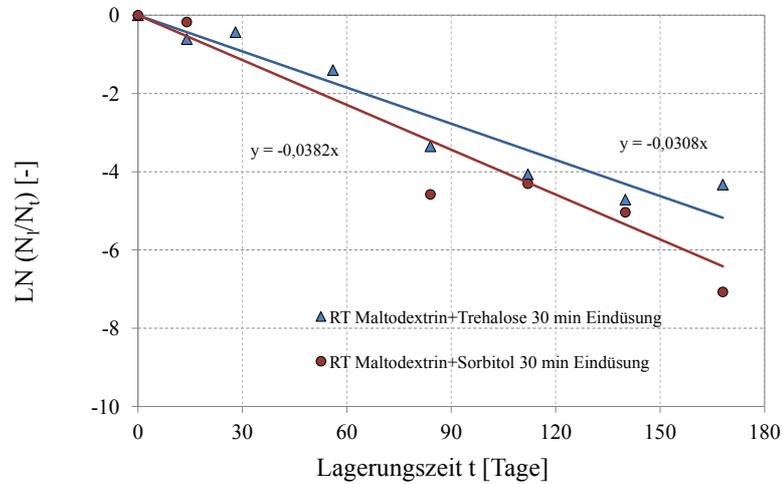
In der nachfolgenden Abbildung 5.32 wird der natürliche Logarithmus der Lebendzellzahlen  $N_l$  während der Lagerung, bezogen auf die Lebendzellzahl nach der Trocknung  $N_t$ , bei  $4^\circ\text{C}$  unter Einsatz der Zellschutzstoffe Trehalose und Sorbitol abgebildet. Aus den Regressionsgeraden werden die jeweiligen Inaktivierungskonstanten ermittelt.



**Abbildung 5.32:** Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* während der Lagerung  $N_t$  [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_0$  [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin sowie der Schutzstoffe Trehalose und Sorbitol

Aus der Abbildung 5.32 geht hervor, dass die Lebendzellzahlen von *L.plantarum* über die gesamte Lagerdauer einen ähnlichen Verlauf zeigen, welcher durch einen stetigen Abfall gekennzeichnet ist, wobei unter Zuhilfenahme von Trehalose ein stärkerer Abfall zu erkennen ist. Aus den Regressionsgeraden ergeben sich Inaktivierungskonstanten für *L.plantarum* in Höhe von  $k_l \text{ Maltodextrin+Trehalose} = 0,020 \pm 0,002 \text{ Tage}^{-1}$  und  $k_l \text{ Maltodextrin+Sorbitol} = 0,018 \pm 0,008 \text{ Tage}^{-1}$ .

In der Abbildung 5.33 werden die Ergebnisse aus den Lagerungsexperimenten bei Raumtemperatur visualisiert. Auf diese Weise wird der Einfluss der verschiedenen Zellschutzstoffe bei Raumtemperatur untersucht.

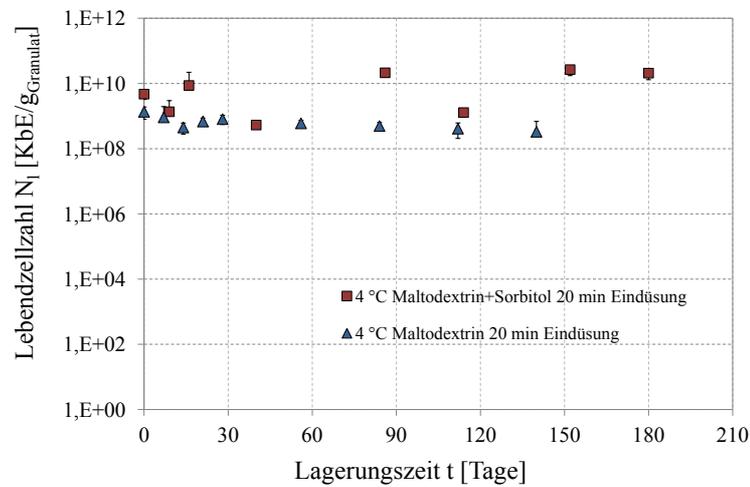


**Abbildung 5.33:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* während der Lagerung  $N_t$  [KbE/g], bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_0$  [KbE/g] nach der Trocknung, bei Verwendung der Trägermaterialien Maltodextrin sowie der Schutzstoffe Trehalose und Sorbitol

Wie in der Abbildung 5.33 zu erkennen ist, ähneln sich auch bei Raumtemperatur die Verläufe der Lebendzellzahlen unter Verwendung von Maltodextrin sowie der jeweiligen Schutzstoffe Trehalose und Sorbitol über die gesamte Lagerungsdauer. In dieser Zeitspanne nehmen die Lebendzellzahlen bis zum Ende der Lagerung stetig ab. Die Inaktivierungskonstanten erreichen Werte in Höhe von  $k_l \text{ Maltodextrin+Trehalose} = 0,031 \pm 0,018 \text{ Tage}^{-1}$  und  $k_l \text{ Maltodextrin+Sorbitol} = 0,038 \pm 0,009 \text{ Tage}^{-1}$ .

### 20 Minuten Eindüsung

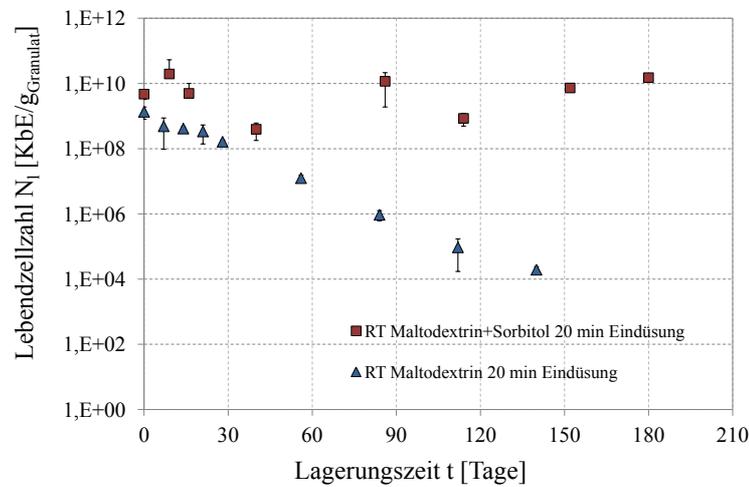
Für die Untersuchung, inwieweit sich die kürzeren Prozesszeiten auf die Lagerstabilität der Bakterien auswirken, werden erneut Granulierungen durchgeführt ohne vorherige Zugabe eines Schutzstoffes. Diese Ergebnisse werden mit jenen verglichen, bei denen ein Schutzstoff eingesetzt wurde. Wiederholt ist der Verlauf der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol beziehungsweise Maltodextrin ohne Zugabe eines Schutzstoffes über eine Lagerdauer von sechs Monaten bei Raumtemperatur und 4 °C in den folgenden Abbildungen zu sehen. Die Ergebnisse aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C zeigt die Abbildung 5.34.



**Abbildung 5.34:** Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Lebendzellzahl  $N_l$  in KbE/g Granulat von *L.plantarum* bei Verwendung von Maltodextrin mit und ohne Zugabe des Zellschutzstoffes Sorbitol

Unabhängig von der Zugabe des Schutzstoffes Sorbitol ergibt sich über die gesamte Lagerdauer ein konstanter Verlauf der Lebendzellzahlen von *L.plantarum* bei 4 °C. Zu Beginn beträgt die Anzahl der lebenden Zellen bei beiden Lagerungsexperimenten ca.  $10^9$  KbE/g Granulat. Diese schwankt im Laufe der Lagerungszeit innerhalb des Fehlerbereichs zwischen  $10^8$  und  $10^{10}$  KbE/g Granulat. Die Bestimmung der Restwassergehalte und der Wasseraktivitäten am Ende der Lagerungszeit weisen Werte auf, die vergleichbar mit denen direkt nach der Trocknung sind. Diese betragen für die mit Sorbitol versehenen Bakterien einen Restwassergehalt von  $X_e = 4,6 \pm 0,2\%$  sowie eine Wasseraktivität von  $a_w = 0,13 \pm 0,03$  %. Im Falle der nicht mit Sorbitol angereicherten Bakterien ergeben sich ein Restwassergehalt von  $X_e = 5,9 \pm 0,2\%$  und eine Wasseraktivität von  $a_w = 0,20 \pm 0,01$  %.

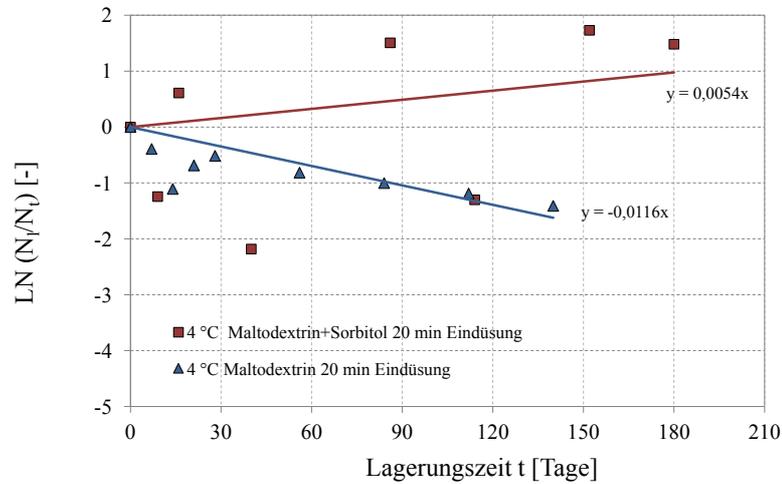
Der Einfluss höherer Lagerungstemperaturen auf die Viabilität von *L.plantarum* ist in der Abbildung 5.35 dargelegt.



**Abbildung 5.35:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Lebendzellzahl  $N_l$  in KbE/g Granulat von *L.plantarum* bei Verwendung von Maltodextrin mit und ohne Zugabe des Zellschutzstoffes Sorbitol

Bei der Lagerung von *L.plantarum* bei Raumtemperatur ergeben sich bei den Bakterien, die ohne Zugabe des Schutzstoffes Sorbitol getrocknet wurden, Unterschiede in den Verläufen der Lebendzellzahlen im Vergleich zu denen, die vor der Trocknung mit dem Schutzstoff versehen wurden. Diese sinkt nach einer Lagerdauer von 140 Tagen von  $10^9$  KbE/g Granulat auf  $10^4$  KbE/g Granulat ab. Zu diesem Zeitpunkt wird ein Restwassergehalt von  $X_e = 6,6 \pm 0,4\%$  und eine Wasseraktivität in Höhe von  $a_w = 0,38 \pm 0,02$  % gemessen. Das Absinken der Lebendzellzahl ist auf die hohen Wasseraktivitäten und -gehalte zurückzuführen. Unter Zuhilfenahme des Zellschutzstoffes Sorbitol verändert sich der Verlauf der Lebendzellzahlen von *L.plantarum*. Dieser ist gekennzeichnet durch eine konstante Lebendzellzahl, die im Größenbereich von  $10^8$  KbE/g Granulat und  $10^{10}$  KbE/g Granulat liegt. Die hergestellten Granulate weisen nach dieser Lagerungsdauer einen Wassergehalt von  $X_e = 5,2 \pm 0,7\%$  und eine Wasseraktivität von  $a_w = 0,44 \pm 0,01$  % auf. Demnach werden, bei den hier durchgeführten Versuchen, vergleichbare Wasseraktivitäten, die sich jedoch in ihren Wassergehalten unterscheiden, erreicht. Die Diskussion dazu erfolgt abermals in dem Abschnitt 5.4.3.

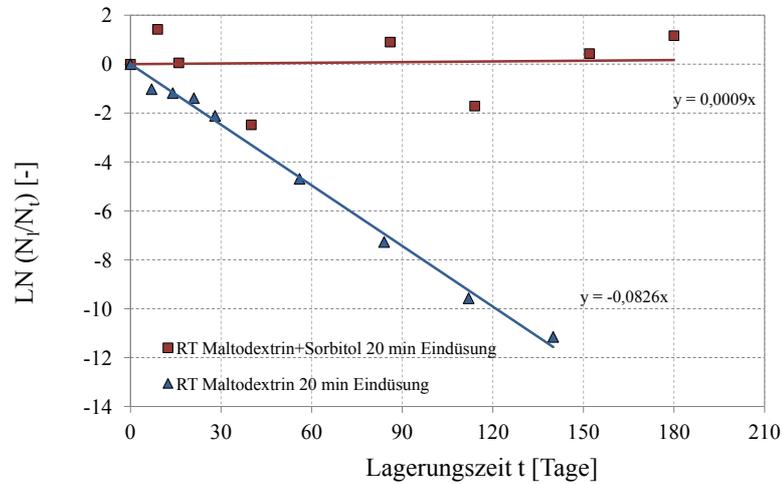
Zur Bestimmung der Inaktivierungskonstanten wird wiederholt der natürliche Logarithmus von den Lebendzellzahlen nach einer bestimmten Lagerungszeit  $N_l$  und der Lebendzellzahl nach der Trocknung  $N_t$  gebildet und daraus die Regressionsgerade ermittelt. In der Abbildung 5.36 ist der natürliche Logarithmus der Lebendzellzahlen aus den Versuchen mit und ohne Zugabe des Schutzstoffes Sorbitol bei Verwendung des Trägermaterials Maltodextrin über eine Lagerdauer von maximal sechs Monaten dargestellt.



**Abbildung 5.36:** Lebendzellzahl von *L.plantarum* während der Lagerung  $N_t$  [KbE/g] bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_0$  [KbE/g] nach der Trocknung, 20 Minuten Eindüsung und zehn Minuten Nachdöschung. Die Lagerung erfolgt über sechs Monate bei 4 °C

Der Abbildung 5.36 kann entnommen werden, dass sich die Verläufe der Lebendzellzahlen bei einer Lagerung von 4 °C deutlicher als in der Darstellung von Abbildung 5.34 voneinander unterscheiden. Dabei ist ein stärkerer Abfall der Lebendzellzahlen bei den Experimenten zu erkennen, bei denen die Trocknung ohne Sorbitol erfolgte. Die Inaktivierungskonstanten aus den Regressionsgeraden belaufen sich bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol auf  $k_l \text{ Maltodextrin+Sorbitol} = -0,005 \pm 0,005 \text{ Tage}^{-1}$  und bei Maltodextrin ohne Zugabe von Sorbitol auf  $k_l \text{ Maltodextrin} = 0,012 \pm 0,005 \text{ Tage}^{-1}$ .

Der Einfluss des Zellschutzstoffes Sorbitol auf die Lagerstabilität von *L.plantarum* bei Raumtemperatur wird in der Abbildung 5.37 wiederholt durch die Bildung des Logarithmus der Zellzahlen und der sich daraus ableitenden Regressionsgeraden dargelegt.



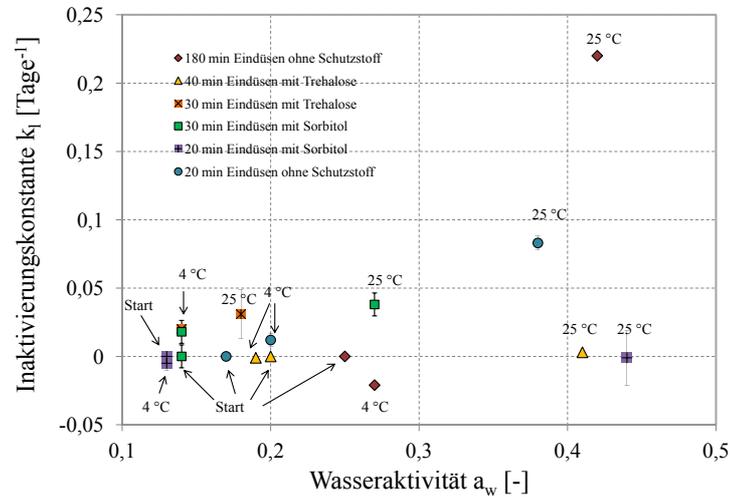
**Abbildung 5.37:** Logarithmus der Lebendzellzahl von *L.plantarum* während der Lagerung  $N_t$  [KbE/g] bezogen auf die Lebendzellzahl  $N_i$  [KbE/g] nach der Trocknung, 20 Minuten Eindüsung und zehn Minuten Nachtrocknung. Die Lagerung erfolgt über sechs Monate bei Raumtemperatur

Gemäß der Abbildung 5.37 ist auch hier ein deutlicher Unterschied der Verläufe der Lebendzellzahlen bei Raumtemperatur über den gesamten Zeitraum erkennbar. Während der Lagerung kommt es bei Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol zu keinem Abfall der Lebendzellzahlen. Aus der Regressionsgeraden ergibt sich eine Inaktivierungskonstante von  $k_l \text{ Maltodextrin+Sorbitol} = -0,001 \pm 0,020 \text{ Tage}^{-1}$ . Im Vergleich dazu ist der Verlauf der Lebendzellzahlen ohne das Vorhandensein von Sorbitol durch ein stetiges Absinken gekennzeichnet und weist nach einer Lagerung von 140 Tagen eine Inaktivierungskonstante von  $k_l \text{ Maltodextrin} = 0,083 \pm 0,005 \text{ Tage}^{-1}$  auf.

#### 5.4.2 Zusammenhang zwischen Wasseraktivität und Inaktivierungskonstante

Zum besseren Überblick werden in der folgenden Abbildung die berechneten Inaktivierungskonstanten von *L.plantarum* aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C und Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Wasseraktivität aufgezeigt. Da sich im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente Maltodextrin als geeignetes Trägermaterial herausstellte, werden in der Abbildung 5.38 ausschließlich die Inaktivierungskonstanten mit den dazugehörigen Wasseraktivitäten von den Versuchen gezeigt, bei denen Maltodextrin Verwendung fand. Die Auswirkungen unterschiedlicher Eindüsungszeiten und die Zugabe von Schutzstoffen auf die Inaktivierungsrate wird in dieser Darstellung deutlich. Zusätzlich wird gezeigt, inwieweit sich die Wasseraktivität und der Wassergehalt der Granulate nach einer Lagerungszeit von sechs Monaten bei 4 °C und 25 °C ändern und welchen Einfluss diese Änderung auf die Inaktivierungskonstante hat. Die Beschriftung 'Start' steht für den

Wasseraktivitätswert, der nach der Trocknung ermittelt wurde. Dieser repräsentiert den Startwert für die Lagerung zum Zeitpunkt  $t = 0$  Tage und  $k_l = 0 \text{ Tage}^{-1}$ .



**Abbildung 5.38:** Zusammenhang zwischen Wasseraktivität und Inaktivierungskonstante aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C und Raumtemperatur über sechs Monate

In der Abbildung 5.38 ist zu erkennen, dass die Inaktivierungskonstanten bei Verwendung von Maltodextrin in Abhängigkeit von der Eindüsenzeit in die Wirbelschicht mit zunehmender Lagerungstemperatur ansteigen. Eine Ausnahme dabei bilden die Granulate, die mit den Schutzstoffen Sorbitol beziehungsweise Trehalose versehen sind. Diese weisen zwar hohe Wasseraktivitäten auf, jedoch ist hier nach sechs Monaten Lagerung ein unerheblicher Viabilitätsverlust zu erkennen. Angesichts dieser Tatsache wird hier die schützende Wirkung sowohl von Trehalose als auch von Sorbitol deutlich.

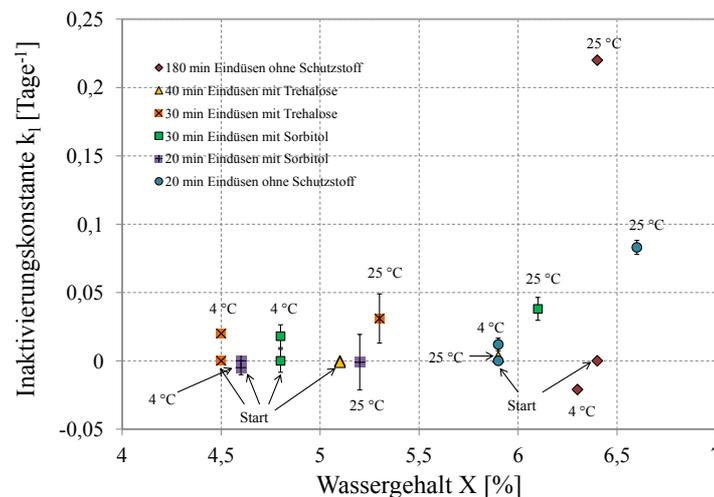
Auffallend in der Abbildung 5.38 ist der Datenpunkt aus dem Trocknungsversuch, bei dem die Bakteriensuspension 180 Minuten ohne vorherige Zugabe eines Zellschutzstoffes in die Wirbelschichtanlage eingedüst wurde. Hier wird die höchste Inaktivierungskonstante und ein im Vergleich zu den anderen Daten hoher Wasseraktivitätswert erreicht. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die hohe Inaktivierung die Folge des fehlenden Schutzstoffes ist. Bestätigt wird diese Beobachtung durch die Versuche, bei denen die Bakterien 20 Minuten ohne Zugabe eines Schutzstoffes in die Wirbelschichtanlage eingedüst wurden. Gleichermäßen wird hier im Vergleich zu den anderen ermittelten Daten eine hohe Inaktivierungskonstante erreicht.

Des Weiteren ist in dem Diagramm ersichtlich, dass auch die Wasseraktivitäten der gelagerten bioaktiven Granulate mit zunehmender Lagerungstemperatur ansteigen. Dies liegt an dem größer werdenden Wasserdampfdruck über der Probe in Abhängigkeit von der Temperatur. Dieser steigt mit zunehmender Temperatur an, bis sich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen dem Dampf und der Feuchtigkeit in der Probe einstellt. Dadurch erhöht sich die Menge des freien, nicht gebundenen Wassers in den Granulaten, welche sich wiederum bei Abwesenheit von Schutzstoffen negativ auf die Lagerstabilität der

Bakterien auswirkt. Die Wasseraktivitäten liegen in dem Wertebereich zwischen 0,18 und 0,43. Auf Grund des eben beschriebenen Zusammenhanges zwischen der Temperatur und dem Wasserdampfdruck ergeben sich bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C niedrigere Wasseraktivitätswerte, welche unterhalb der Werte bei Raumtemperatur liegen.

### 5.4.3 Zusammenhang zwischen Wassergehalt und Inaktivierungskonstante

Neben dem Einfluss der Wasseraktivität auf die Lagerstabilität von *L.plantarum* wird gleichermaßen der Einfluss des Wassergehaltes während der Lagerungsexperimente untersucht. Für die Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Inaktivierung und dem Wassergehalt der Granulate werden beide Größen in Abhängigkeit voneinander in der Abbildung 5.39 aufgeführt. Bei den dargestellten Wassergehalten handelt es sich um jene, die nach der Trocknung und am Ende der Lagerungsexperimente nach sechs Monaten bestimmt wurden. Wiederholt repräsentiert der Ausdruck 'Start' in der Abbildung 5.39 den Anfangswert des Wassergehaltes zum Lagerungszeitpunkt  $t = 0$  Tage.



**Abbildung 5.39:** Zusammenhang zwischen Wassergehalt und Inaktivierungskonstante aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C und 25 °C über sechs Monate

Aus der Abbildung 5.39 geht hervor, dass der Wassergehalt der bioaktiven Maltodextrin-Granulate mit zunehmender Lagerungstemperatur ansteigt. Der Grund dafür ist, analog zu der ansteigenden Wasseraktivität, der bei Raumtemperatur vorherrschende größere Wasserdampfdruck über den Granulaten. Dadurch steigt die Menge des freien Wassers in den Granulaten an, welche sich wiederum in einer Erhöhung des Wassergehaltes bemerkbar macht.

Eine Ausnahme dabei bilden jene, die 180 Minuten in die Wirbelschicht eingedüst wurden. Der Wassergehalt bei diesen Proben weist am Ende der Experimente im Falle der Lagerung bei Raumtemperatur einen Wert von 6,4 % und bei 4 °C einen Wert in Höhe

von 6,3 % auf. Demzufolge existiert bei diesen Proben kein Unterschied in den Wassergehalten, der auf die Lagerungstemperatur zurückzuführen ist. Es wird geschlussfolgert, dass infolge des hohen Anfangswassergehaltes das thermische Gleichgewicht zwischen dem Wasserdampf und der Feuchtigkeit der Granulate bereits zu Beginn erreicht wurde und dadurch der Wassergehalt nicht weiter zunimmt. Bezüglich der Inaktivierungskonstanten bei einer Lagerung bei 4 °C und Raumtemperatur besteht ein Unterschied.. Diese sind bei Raumtemperatur ohne Zugabe eines Schutzstoffes deutlich höher ( $k_l = 0,220 \text{ Tage}^{-1}$ ) als bei 4 °C ( $k_l = -0,021 \text{ Tage}^{-1}$ ). Der Grund dafür liegt in der niedrigen Temperatur. Bei 4 °C sind alle während der Lagerung auftretenden Reaktionen verlangsamt, wobei auch die Abbaureaktionen nur schleichend erfolgen. Mit zunehmender Temperatur erhöht sich die Reaktionsfähigkeit und Abbauprozesse finden dadurch schneller statt. Darüber hinaus wird in der Abbildung deutlich, dass die hohe Inaktivierung bei den Bakterien auftritt, welche ohne vorherige Zugabe von Schutzstoffen bei Raumtemperatur gelagert wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass durch die Zugabe von Schutzstoffen die Lagerfähigkeit von *L.plantarum* bei Raumtemperatur verbessert wird, wobei sich Trehalose als Stabilisator bei Abbauprozessen von Proteinen und Lipiden auszeichnet und die Fähigkeit besitzt, freies Wasser zu binden. Hingegen ist Sorbitol für seine antioxidative Wirkung bekannt und verhindert dadurch auftretende Lipidoxidationen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich durch die Zugabe von Schutzstoffen die Lagerfähigkeit von *L.plantarum* bei Raumtemperatur deutlich steigert und diese eine Lagerung bei höheren Wasseraktivitäten, als die aus der Literatur (Teixeira et al., 1995), (Chen and Patel, 2007) bekannten in Höhe von  $a_w = 0,2$ , erlaubt. Demnach ist der Einsatz von Schutzstoffen für die Lagerung bei Raumtemperatur unverzichtbar. In der Arbeit von Wang et al. (2004) konnte festgestellt werden, dass sich die Lagerfähigkeit der Milchsäurebakterien bei 25 °C zusätzlich verbessert, wenn diese in Vakuumverpackungen gelagert werden. Aus diesem Grund sollten die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Glasflaschen durch Vakuumverpackungen ersetzt werden um einen Stoffaustausch zwischen der Umgebung und der Probe zu verhindern. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei einer Temperatur von 4 °C unter Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial im Vergleich zu den Trägermaterialien Zuckerpellets und Laktose keine Veränderungen sowohl in den Lebendzellzahlen, der Wasseraktivität als auch in den Wassergehalten, auftreten. Eine Zusammenfassung aller ermittelten Wassergehalte, -aktivitäten und Inaktivierungskonstanten befindet sich im Anhang A.4 dieser Arbeit. Auf Grund der gewonnenen Erkenntnisse eignet sich Maltodextrin demnach hervorragend als Trägermaterial für die Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum*.

#### 5.4.4 Vergleich Inaktivierungskonstante Trocknung und Lagerung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten sowohl für die Trocknung als auch für die Lagerung bestimmt. Jene werden bei der Beschreibung der Trocknung in  $k_X$  und  $k_T$  unterteilt. Damit konnte gezeigt werden, in welchem Maße thermische und dehydrierende Beanspruchungen zur Inaktivierung führen. Bei der Angabe der Konstanten  $k_l$  für die Lagerung kommt es nicht zu einer derartigen Aufteilung in thermischer und dehydrierender Schädigung. Vielmehr sind in der Konstante  $k_l$  alle Schädigungsfaktoren vereint. Jedoch muss für den Vergleich der Konstanten  $k_t$  und  $k_l$  untereinander gleichermaßen die Gesamtheit der Zellschäden, die aus der Trocknung

resultieren, erfasst werden. Diese werden in der Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten  $k_t$  berücksichtigt. Ermittelt wird der  $k_t$ -Wert durch die Bestimmung der Lebendzellzahl während eines Wirbelschichttrocknungsprozesses unter Anwendung der in der Tabelle 5.2 genannten Parameter. Hierbei wird ohne Einsatz eines Schutzstoffes die Bakteriensuspension 20 Minuten in die Anlage eingedüst und zehn Minuten nachgetrocknet. Dabei wird erneut die Änderung der Lebendzellzahl zum Ausgangszustand ( $t = 0$ ) mit  $A = N_t/N_0$  ermittelt und die Viabilität nach der Gleichung 3.8 berechnet. Die Ergebnisse dazu befinden sich im Anhang dieser Arbeit, Abschnitt A.4.2. Der Vergleich der Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten, die sich infolge der Trocknung und Lagerung ergeben, ist in der Tabelle 5.6 dargestellt.

**Tabelle 5.6:** Vergleich der durch die Trocknung und Lagerung hervorgerufenen Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten von *L.plantarum*

Inaktivierungskonstante	Wert
Während der Trocknung $k_t$	0,154 $min^{-1}$
Während der Lagerung bei RT $k_l$	0,083 $Tage^{-1}$
Während der Lagerung bei 4 °C $k_l$	0,012 $Tage^{-1}$

In der Tabelle 5.6 wird ersichtlich, dass sich die Inaktivierungskonstanten der Trocknung und Lagerung erheblich voneinander unterscheiden. Die durch die Trocknung hervorgerufene Inaktivierung ist deutlich schneller. Dies liegt an der stärkeren Beanspruchung während der Nachtrocknung, die, wie bereits im Abschnitt 5.3 gezeigt wurde, auf die Dehydrierung zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu kommt es während der Lagerung nicht zu einer derartigen Beanspruchung. Mit Hilfe der Lagerungsversuche konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung schleichend und in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen erfolgt.

(Higl et al., 2007) und (Foerst et al., 2012) ermittelten in ihren Arbeiten die Inaktivierungskonstanten während der Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen und  $a_w$ -Werten für *L.paracasei*. Dabei wurden die getrockneten Mikroorganismen zum Einen durch Vakuumtrocknung und zum Anderen durch Gefriertrocknung erzeugt. Der Vergleich der Inaktivierungskonstanten unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Herstellungsverfahren zeigt die Tabelle 5.7.

**Tabelle 5.7:** Inaktivierungskonstanten vakuumgetrockneter, gefriergetrockneter und wirbelschichtgetrockneter Milchsäurebakterien bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen <sup>a</sup> Foerst et al. (2012), <sup>b</sup> Higl et al. (2007)

Herstellungsverfahren	T [°C]	$a_w$ [-]	$k_l$ [Tage <sup>-1</sup> ]
Vakuumtrocknung (ohne Schutzstoff) <sup>a</sup>	20	0,22	0,006
		0,33	0,016
Gefriertrocknung mit Laktose <sup>b</sup>	4	0,22	0,017
		0,33	0,023
	20	0,22	0,077
		0,33	0,11
Wirbelschichttrocknung ohne Schutzstoff	4	0,20	0,012
	25	0,38	0,083
Wirbelschichttrocknung mit Sorbitol	4	0,13	-0,005
	25	0,44	-0,001

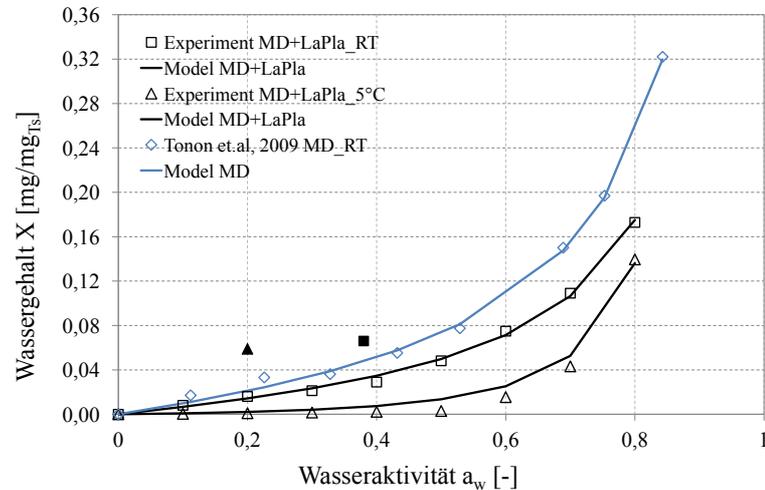
Der Vergleich der Inaktivierungskonstanten zeigt, dass sich durch die Kombination aus Schutzstoff und Wirbelschichttrocknung geringere Inaktivierungskonstanten für *L.plantarum* bei Raumtemperatur ergeben als dies bei der Gefriertrocknung von *L.paracasei* der Fall ist. Demgegenüber werden ähnliche Inaktivierungskonstanten wie bei der Vakuumtrocknung ermittelt.

#### 5.4.5 Sorptionsisothermen

Von den in der Wirbelschicht hergestellten Granulaten werden nach der Trocknung die Adsorptions- und Desorptionsisothermen, wie eingehend in dem Abschnitt 2.3.3 erklärt, bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten und den für diese Arbeit relevanten Lagerungstemperaturen aufgenommen. In den nachfolgenden Abbildungen wird sich auf die Darstellung der Adsorptionsisothermen konzentriert, da diese für die Angabe des Stabilitätsbereiches für die spätere Lagerung von Bedeutung sind und bei Kenntnis der Temperatur und relativen Feuchte der Umgebung der Wassergehalt der Probe ermittelt werden kann.

Die experimentellen Daten aus der Sorptionsanalyse, von dem Gemisch aus Maltodextrin und *L.plantarum* sowie dem Dreifachgemisch aus Maltodextrin, *L.plantarum* und Sorbitol bzw. Trehalose, werden durch die Betrachtung höherer  $a_w$ -Wert Bereiche mit Hilfe des GAB-Modells beschrieben. Die Abbildung 5.40 zeigt das Adsorptionsverhalten der bioaktiven Granulate, bestehend aus Maltodextrin und *L.plantarum*, bei 5 °C und Raumtemperatur. Die nicht ausgefüllten Symbole innerhalb der Abbildung kennzeichnen die experimentell ermittelten Messdaten, wohingegen die ausgefüllten Symbole für die Daten nach der Beendigung der Lagerungsexperimente stehen und die Linien die ermittelten Daten aus dem GAB-Modell darstellen. Auf Grund von Einschränkungen in der Temperatureinstellung am Messgerät kann die Aufnahme der Sorptionsisotherme nicht bei 4 °C

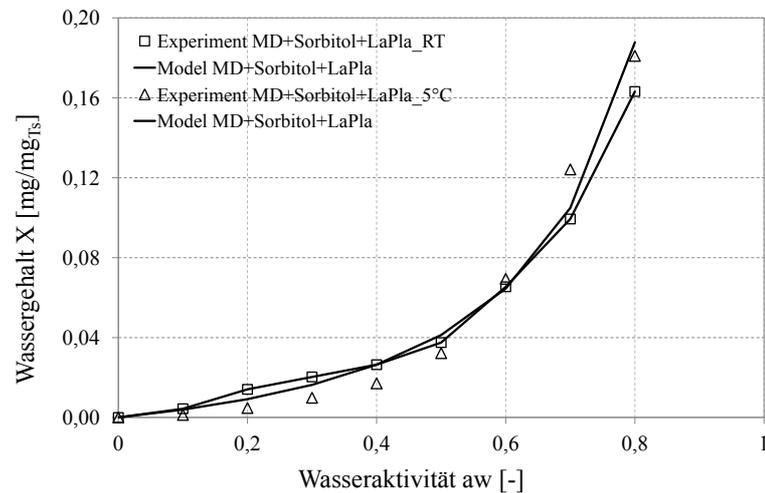
erfolgen, sondern wird bei 5 °C durchgeführt.



**Abbildung 5.40:** Adsorptionsverhalten wirbelschichtgetrockneter Maltodextrin und *L.plantarum* Granulate bei 5 °C und Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Wasseraktivität (Symbole stehen für die experimentellen Daten, die Linien für die durch das GAB-Modell angepassten Daten)

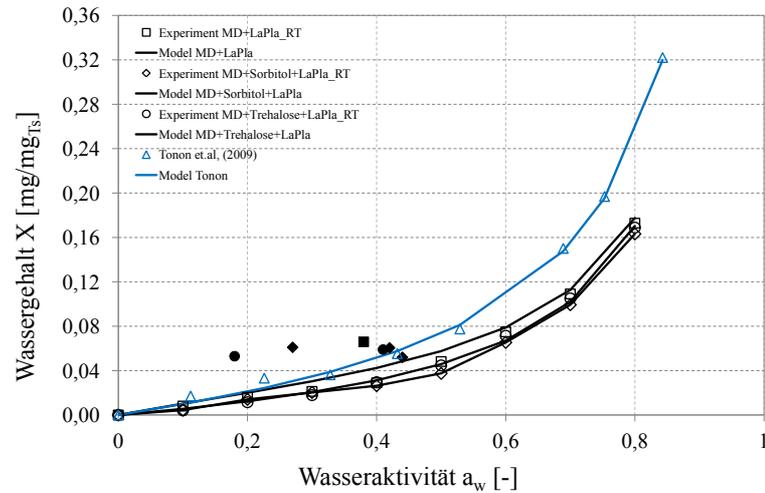
Die dargestellten Isothermen zeigen einen für Zucker charakteristischen Verlauf. Dieser gehört zum Typ III der am häufigsten vorkommenden Adsorptionsisothermen. Die Verläufe der dargestellten Isothermen unterscheiden sich jedoch in Abhängigkeit von der Temperatur. Mit zunehmender Temperatur steigen, bis zum Erreichen des Feuchtegleichgewichts bei gleichbleibender Wasseraktivität, die Wassergehalte der Granulate an. Somit zeigen die Granulate bei Raumtemperatur ein höheres Sorptionsvermögen als bei 5 °C. Dies steht im Widerspruch zu den physikalischen Gesetzmäßigkeiten, die besagen, dass die kinetische Energie der adsorbierten Moleküle durch die Temperaturerhöhung zunimmt und dadurch die auf der Oberfläche adsorbierte Menge abnimmt. Folglich kann das Sorptionsvermögen bei Raumtemperatur nicht höher als bei 5 °C sein. Die Gründe für die fehlerhafte Aufnahme der Isotherme liegen in der Messung. Als Abbruchkriterium für jeden Feuchteschritt während der Aufnahme der Adsorptionsisotherme wurden hier 1000 Minuten eingestellt. Es wird angenommen, dass zum Ende der Messung kein Feuchtegleichgewicht zwischen dem Granulat und der Umgebung vorlag und es dadurch zur fehlerhaften Aufnahme der Isotherme kam. Zur Überprüfung dieser Annahme sind die Daten von Tonon et al. (2009) mit in der Abbildung 5.40 aufgeführt. Tonon et al. (2009) ermittelte die Sorptionsisotherme von Maltodextrin DE20 bei 25 °C. Wie in der Abbildung zu sehen ist, liegt dieser Verlauf oberhalb der ermittelten Isotherme bei Raumtemperatur. Somit kann die Messung bei 5 °C als falsch angesehen werden. Die Auftragung der Daten aus den Lagerungsexperimenten bestätigen diese Annahme. Nach einer Lagerungszeit von sechs Monaten bei 4 °C weisen die bioaktiven Granulate bei einer Wasseraktivität von 0,2 einen Wassergehalt von 5,9 %. Dieser liegt deutlich oberhalb des experimentell ermittelten Wassergehaltes der Isotherme und spricht somit für die Fehlmessung.

Die Auswirkung der Zugabe von Schutzstoffen auf das Sorptionsverhalten der bioaktiven Granulate, bestehend aus Maltodextrin und *L.plantarum* unter Berücksichtigung unterschiedlicher Lagerungstemperaturen, wird in der Abbildung 5.44 visualisiert. Abermals sind die experimentellen Daten durch Symbole und die Daten aus dem GAB-Modell durch Linien gekennzeichnet.



**Abbildung 5.41:** Sorptionsverhalten wirbelschichtgetrockneter Maltodextrin und *L.plantarum* Granulate mit dem Schutzstoff Sorbitol bei 5 °C und Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Wasseraktivität (Symbole stehen für die experimentellen Daten, die Linien für die durch das GAB-Modell gefitteten Daten)

Im Vergleich zum vorher ermittelten Isothermenverlauf verschiebt sich die Adsorptionskurve bei 5 °C in Richtung derer bei Raumtemperatur. Somit ist kein Unterschied im Sorptionsverhalten erkennbar, der auf die Höhe der Temperatur zurückzuführen ist. Weiterhin zeigt sich, dass die Zugabe des Schutzstoffes Sorbitol keine Veränderung des Verlaufes der Adsorptionsisothermen nach sich zieht. Vermutlich liegt die Ursache dafür in der geringen Zugabemenge von zehn Gramm. Somit wird das Sorptionsverhalten in diesem Experiment lediglich von dem Trägermaterial Maltodextrin bestimmt. Der gleiche Verlauf konnte auch bei den Aufnahmen unter Verwendung von Trehalose als Schutzstoff beobachtet werden. Dieser ist in der Abbildung 5.42 für Raumtemperatur dargestellt. Wiederholt sind die Daten von Tonon et al. (2009) und jene, die nach der Lagerungszeit bestimmt wurden, in der Abbildung mit aufgeführt. Die ausgefüllten Symbole repräsentieren die Wassergehalte und -aktivitätswerte nach einer Lagerung von sechs Monaten bei Raumtemperatur.



**Abbildung 5.42:** Sorptionsverhalten verschiedener wirbelschichtgetrockneter Maltodextrin und *L.plantarum* Granulate bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Wasseraktivität (Symbole stehen für die experimentellen Daten, die Linien für die durch das GAB-Modell gefitteten Daten)

Bei Raumtemperatur weisen alle Kurven einen ähnlichen Verlauf, unabhängig von der Zugabe der Zellschutzstoffe Trehalose oder Sorbitol, auf. Erneut liegt die von (Tonon et al., 2009) ermittelte Isotherme oberhalb der Gezeigten. Darüber hinaus sind die Wassergehalte der bioaktiven Granulate nach einer Lagerungszeit von sechs Monaten größer als die Ermittelten aus der Isothermen. Demnach wird wiederholt angenommen, dass das Feuchtgleichgewicht zwischen dem Granulat und der Umgebung bei der durchgeführten Messung nicht erreicht war und es deshalb zu Abweichungen in den Daten kommt.

In der Tabelle 5.8 sind die aus der Anpassung ermittelten GAB-Parameter sowohl für das Gemisch aus *L.plantarum* und Maltodextrin als auch für das Dreifachgemisch aus *L.plantarum*, Maltodextrin und dem jeweiligen Schutzstoff Sorbitol oder Trehalose aufgelistet. Aus diesen Parametern kann der Wassergehalt der Monoschicht  $M_{max}$  abgelesen werden. Mit Hilfe der Bestimmung dieses Wertes ist der Wassergehalt bekannt, bei dem die Granulate ohne Viabilitätsverlust gelagert werden können. Für den Vergleich der aus der GAB-Gleichung ermittelten Koeffizienten werden die Daten von Bouquerand et al. (2008) und Tonon et al. (2009) gezeigt.

**Tabelle 5.8:** Wassergehalt der Monoschicht  $M_{max}$  und Konstanten C, L aus der GAB-Gleichung <sup>a</sup> Tonon et al.(2009), <sup>b</sup> Bouquerand et al.(2008)

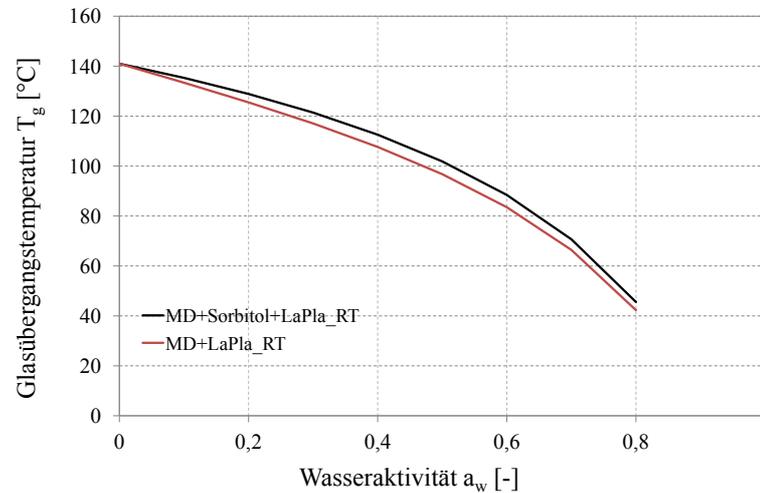
Material	T [°C]	$a_w$ -Bereich	$M_{max}[kg/kgT_s]$	C	L	$R^2$
L.pla+MD20	25	0-0,8	0,041	1,563	0,999	0,99
L.pla+MD20+Sorbitol	25	0-0,8	0,040	1,112	1,000	0,99
L.pla+MD20+Trehalose	25	0-0,8	0,041	1,267	0,998	0,99
MD 20 <sup>a</sup>	25	0-0,843	0,063	1,510	0,981	0,99
MD 19 <sup>b</sup>	30	0-0,950	0,063	40	0,910	-

Da die Sorptionsisotherme unter Verwendung von Maltodextrin und *L.plantarum* bei 5°C keinen realistischen Verlauf zeigte, wird hier auf die Darstellung der GAB-Parameter verzichtet. Bei Raumtemperatur ergibt sich ein Wassergehalt der Monoschicht von  $4,1 g \cdot 100g_{T_s}^{-1}$ . Ähnliche Wassergehalte der Monoschicht werden bei Verwendung von Maltodextrin, Sorbitol beziehungsweise Trehalose und *L.plantarum* in Höhe von 4,0 und  $4,1 g \cdot 100g_{T_s}^{-1}$  berechnet. Die Abweichungen in den Konstanten C und L kommen auf Grund von Messunsicherheiten zustande. Bei dem Vergleich der Daten von Tonon et al. (2009) ergeben sich kleine Unterschiede. Dieser ermittelte einen etwas höheren Wassergehalt der Monoschicht von  $6,3 g \cdot 100g_{T_s}^{-1}$ . Dies spiegelt sich in dem unterschiedlichen Verlauf der Isotherme wider, welche oberhalb der hier ermittelten Isotherme lag.

#### 5.4.6 Glasübergangstemperatur

Bei der Darstellung der Glasübergangstemperaturen in der Abbildung 5.43 handelt es sich nicht um experimentell bestimmte sondern um berechnete Daten. Diese wurden in Anlehnung an Roos (1993) mit Hilfe der zuvor in dem Abschnitt 2.3 vorgestellten Regressionsgeraden  $k = 0,0293 T_g + 3,61$  ermittelt. Für Maltodextrin mit einem Dextrose-Äquivalent von 20 % beträgt die wasserfreie Glasübergangstemperatur nach Roos and Karel (1991b) 141 °C. Somit ergibt sich für k ein Wert in Höhe von 7,74. Da das Vorhandensein von Bakterien nach Aussagen von Fonseca et al. (2001) und Higl (2008) keinen Einfluss auf die Glasübergangstemperatur hat, bleiben diese in der Berechnung unberücksichtigt. Somit wird ausgehend von einem binären Gemisch, bestehend aus Maltodextrin und Wasser, für die Berechnung der Glasübergangskurve die Gordon-Taylor Gleichung 2.8 verwendet. Die zur Berechnung benötigten Massenanteile der jeweiligen Komponenten werden aus der Sorptionsanalyse, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, entnommen. Die ermittelten Wassergehalte stellen dabei die Maximalwerte dar, welche durch die Granulate bei einer bestimmten relativen Feuchte und Temperatur, unter Berücksichtigung des Abbruchkriteriums nach 1000 Minuten Messung, aufgenommen wurden. Da sich in den vorhergehenden Untersuchungen herausstellte, dass die Zugabe der Zellschutzstoffe keine Veränderung des Sorptionsverhaltens nach sich ziehen, wird bei der Berechnung der Glasübergangstemperatur für dieses Dreifachgemisch auf die Gordon-Taylor-Gleichung zur Bestimmung der Glasübergangstemperatur eines Zweifachgemisches, bestehend aus Maltodextrin und Wasser, zurückgegriffen und für k der Faktor 7,74 eingesetzt. In der Abbildung 5.43 ist der Verlauf der Glasübergangskurve des Zweifach- und Dreifachgemisches

dargestellt.



**Abbildung 5.43:** Glasübergangstemperatur der bioaktiven Granulate, bestehend aus dem Zweifachgemisch Maltodextrin und *L.plantarum* sowie dem Dreifachgemisch Maltodextrin, *L.plantarum* und Sorbitol, in Abhängigkeit von der Wasseraktivität und dem Sorptionsverhalten bei Raumtemperatur

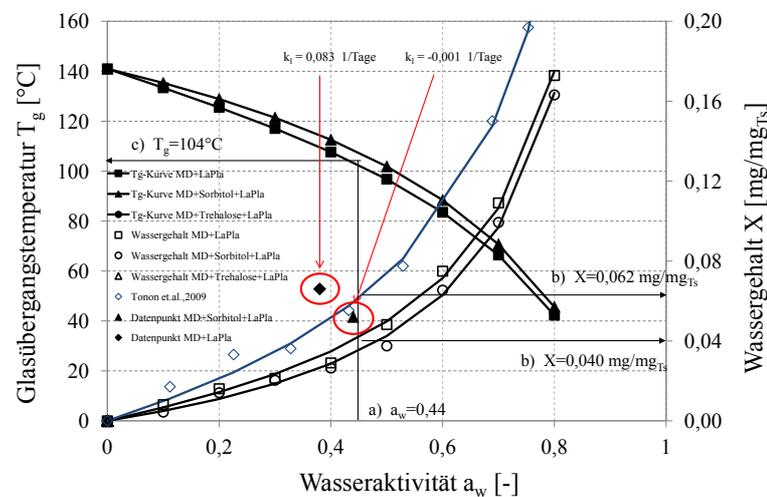
In der Abbildung 5.43 ist zu erkennen, dass sich die Verläufe der Glasübergangskurven kaum voneinander unterscheiden. Beide Kurven sinken mit zunehmender Wasseraktivität gleichermaßen ab. Diese erreichen bei einer Wasseraktivität von 0,8 vergleichbare Glasübergangstemperaturen von 42 °C und 45 °C. Nach einer Lagerungszeit von mindestens sechs Monaten weisen die bioaktiven Granulate aller durchgeführten Experimente Wasseraktivitäten auf, die zwischen 0,18 und 0,44 liegen. Eine detaillierte Auflistung befindet sich im Anhang A.4.1 dieser Arbeit. In Anbetracht der höchsten Wasseraktivität von 0,44 wird ausgehend von der Glasübergangskurve eine Glasübergangstemperatur von 110 °C abgelesen. Somit würde es zu einem Glasübergang kommen, wenn die bioaktiven Granulate oberhalb dieser Temperatur gelagert werden würden. Bei der Lagerung bei Raumtemperatur können somit Viabilitätsverluste, hervorgerufen durch einen möglichen Glasübergang von Maltodextrin, ausgeschlossen werden. Vielmehr kann daraus geschlussfolgert werden, dass sich Maltodextrin für die hier vorherrschenden Lagerungsbedingungen hervorragend als Trägermaterial für die Lagerung getrockneter *L.plantarum* Zellen eignet.

#### 5.4.7 Zustandsdiagramm

In dem nachfolgenden Zustandsdiagramm wird der Zusammenhang zwischen der Glasübergangstemperatur, der Wasseraktivität und dem Wassergehalt der bioaktiven Granulate, bestehend aus Maltodextrin, *L.plantarum* und gegebenenfalls einem Schutzstoff, grafisch dargestellt. Anhand des Zustandsdiagrammes sollen die Lagerungsbedingungen wie Tem-

peratur, Wassergehalt und Wasseraktivität zum Erreichen eines lagerfähigen bioaktiven Granulates abgeleitet werden. Zusätzlich sollen Grenzen angegeben werden, in denen *L.plantarum* lagerstabil ist. Dafür werden zwei Datenpunkte mit aufgeführt, deren Wassergehalt und Wasseraktivität nach der Beendigung der Lagerungsversuche bei Raumtemperatur nach sechs Monaten ermittelt wurden. Am Beispiel dieser sollen die Stabilitätsgrenzen gezeigt werden.

Die Abbildung 5.44 zeigt das Zustandsdiagramm von dem Zweifachgemisch, bestehend aus Maltodextrin und *L.plantarum* sowie dem Dreifachgemisch, bestehend aus Maltodextrin, Schutzstoff und *L.plantarum*. Hierbei findet das Sorptionsverhalten bei Raumtemperatur in der Darstellung Berücksichtigung.



**Abbildung 5.44:** Zusammenhang zwischen Glasübergangstemperatur, Wasseraktivität und Wassergehalt von dem bioaktiven Granulat, bestehend aus *L.plantarum*, Sorbitol und Maltodextrin

Wie aus dem Diagramm hervorgeht, weisen die Isothermen und die Glasübergangstemperaturkurven einen ähnlichen Verlauf auf. Die Beschreibung dieser Verläufe kann dem vorhergehenden Abschnitt entnommen werden. Auf Grund der ähnlichen Verläufe wird sich bei der Beschreibung des Zustandsdiagrammes auf einen Datensatz, beispielsweise den für MD+Sorbitol+LaPla bei Raumtemperatur, beschränkt. Ausgehend von der nach sechs Monaten Lagerung ermittelten Wasseraktivität von 0,44 wird über die Sorptionsisotherme ein Wassergehalt in Höhe von b)  $X = 0,040 \text{ mg/mg}_{T_s}$  abgelesen. Der tatsächliche Wert nach diesem Zeitraum bei Verwendung des Schutzstoffes Sorbitol beträgt jedoch  $X = 0,052 \text{ mg/mg}_{T_s}$  und ohne Einsatz eines Schutzstoffes  $X = 0,062 \text{ mg/mg}_{T_s}$  mit der Wasseraktivität 0,38. Die dazugehörigen Inaktivierungskonstanten aus den Lagerungsexperimenten sind zusätzlich in der Abbildung 5.44 mit aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass die Inaktivierung bei Verwendung des Schutzstoffes Sorbitol kleiner ist, und es werden niedrigere Wassergehalte als ohne Zugabe des Schutzstoffes am Ende der Lagerung erreicht.

Da in dem vorhergehenden Abschnitt die Vermutung formuliert wurde, dass das Feuch-

tegleichgewicht auch bei der Aufnahme der Isotherme bei Raumtemperatur nicht ganz erreicht wurde, werden zusätzlich in der Abbildung die Daten von Tonon et al. (2009) gezeigt. Ausgehend von einer Wasseraktivität von 0,44 ergibt sich über die Sorptionsisotherme von Tonon et al. (2009) ein Wassergehalt in Höhe von  $X = 0,062 \text{ mg/mg}_{T_s}$ . Dieser Wert ist höher als der davor bestimmte Wert und liegt eher in dem Größenbereich der ermittelten Wassergehalte der Granulate aus den Lagerungsexperimenten.

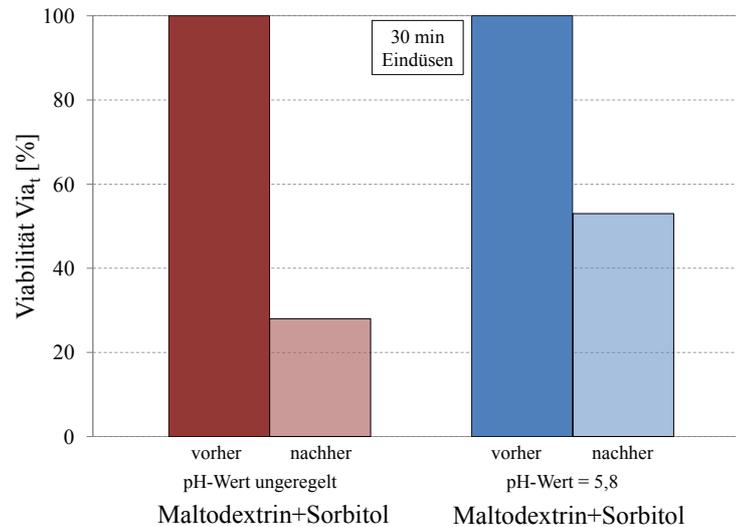
Zusätzlich errechneten Tonon et al. (2009) in ihrer Arbeit für die Monoschicht einen Wassergehalt von  $M_{max} = 0,063 \text{ mg/mg}_{T_s}$ . Unterhalb von diesem Wert ist die Rede von einem lagerstabilen Produkt. Auf Grund der Erkenntnisse, die aus den Lagerungsexperimenten gewonnen wurden, entspricht dieser Wert eher der Grenze für den Stabilitätsbereich. Diese Annahme spiegelt sich in den Inaktivierungskonstanten wider. Im Falle der Lagerung ohne Zugabe eines Schutzstoffes weisen die bioaktiven Granulate bei einem Wassergehalt von  $X = 0,066 \text{ mg/mg}_{T_s}$  eine weitaus größere Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante auf als jene Granulate die mit dem Zellschutzstoff Sorbitol versehen wurden.

Die Stabilitätsgrenze von  $X = 6,3 \%$  kann somit auf die hier ermittelten Ergebnisse übertragen werden und begründet die niedrige Inaktivierungskonstante bei der Lagerung von *L.plantarum* bei Raumtemperatur.

## 5.5 Einfluss der Fermentation auf die Viabilität

Für die Untersuchung des Einflusses veränderter Fermentationsbedingungen auf den Zustand von *L.plantarum* nach der Wirbelschichttrocknung werden erneute Trocknungsversuche mit Zellen durchgeführt, die zuvor durch eine pH-Wert Regelung in einem Bioreaktor mit einem Volumen von zwei Litern erzeugt wurden. Wie bereits in dem Abschnitt 5.1.2 beschrieben, beträgt für eine pH-Wert geregelte Fermentation im zwei Liter Bioreaktor die Biotrockenmasse der Bakterien 7,4 g. Diese Bakterienmasse wird wie bereits in den zuvor durchgeführten Experimenten vorbereitet und anschließend in die Wirbelschichtanlage eingedüst.

In der Abbildung 5.45 wird gezeigt, welchen Einfluss pH-Wert Regelungen während der Fermentation auf die Überlebensrate nach der Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum* haben. Zur Durchführung der Experimente kommt als Trägermaterial Maltodextrin und als Schutzstoff Sorbitol zum Einsatz. Die Eindüsung- und Nachtrocknungszeiten betragen jeweils 30 beziehungsweise zehn Minuten. Wiederholt werden für die Durchführung der Wirbelschichttrocknung die Prozessparameter aus der Tabelle 5.1 verwendet. Von allen Experimenten wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Viabilitäten vor und nach der Trocknung sind in der Abbildung 5.45 dargestellt. Bei der Angabe und Darstellung der Viabilitäten wird analog zu den anderen Versuchen die Standardabweichung vom Mittelwert subtrahiert. Somit handelt es um die minimal erreichten Viabilitäten.



**Abbildung 5.45:** Viabilität pH-Wert geregelter ( $n = 3$ ) und nicht pH-Wert geregelter ( $n = 3$ ) *L. plantarum* Zellen während der Fermentation, vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial und Sorbitol als Schutzstoff bei  $t = 30$  min,  $\vartheta_{ein} = 40$  °C,  $p_{spr} = 4$  bar,  $\dot{M}_{Spr} = 270$  g/h,  $\dot{M}_{L, Malto} = 85$  kg/h. Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten

Wie in der Abbildung 5.45 zu erkennen ist, werden nach der Trocknung von pH-Wert geregelten *L. plantarum* Zellen höhere Viabilitäten als bei nicht pH-Wert geregelten erreicht. Diese erlangen einen Wert von 53 %. Bei der Ermittlung der Restwassergehalte und Wasseraktivitäten dieser Proben werden Werte in Höhe von  $X_a = 5,1 \pm 0,1$  % und  $a_w = 0,14 \pm 0,01$  gemessen. Für einen besseren Überblick werden die bereits bekannten Daten aus den Experimenten zur Trocknung nicht pH-Wert regulierter Zellen mit den Daten pH-Wert geregelter Kulturen in der Tabelle 5.9 zusammengefasst.

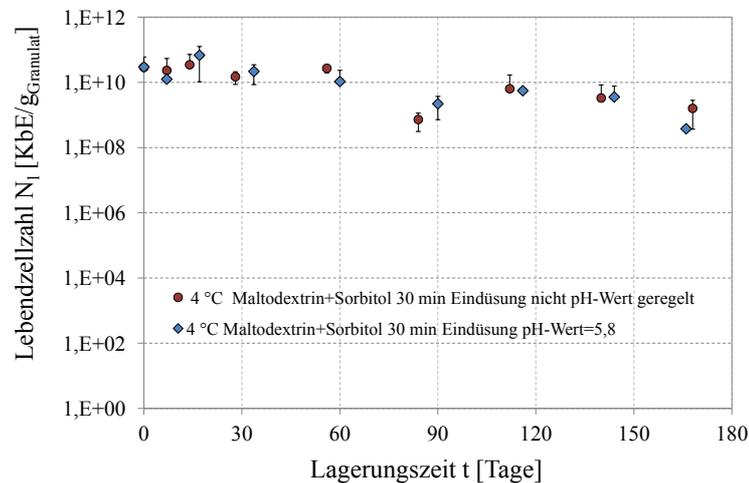
**Tabelle 5.9:** Einfluss von pH-Wert geregelter Fermentation auf die Viabilität, den Wassergehalt und die Wasseraktivität nach der Wirbelschichttrocknung von *L. plantarum* bei einer Eindüsenzeit von 30 Minuten und einer Nachtrocknungszeit von zehn Minuten bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial und Sorbitol als Schutzstoff

pH-Wert geregelt	$Via_t$ [%]	$X_a$ [%]	$a_w$ [-]
nein	28	$4,8 \pm 0,4$	$0,14 \pm 0,01$
5,8	53	$5,1 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,01$

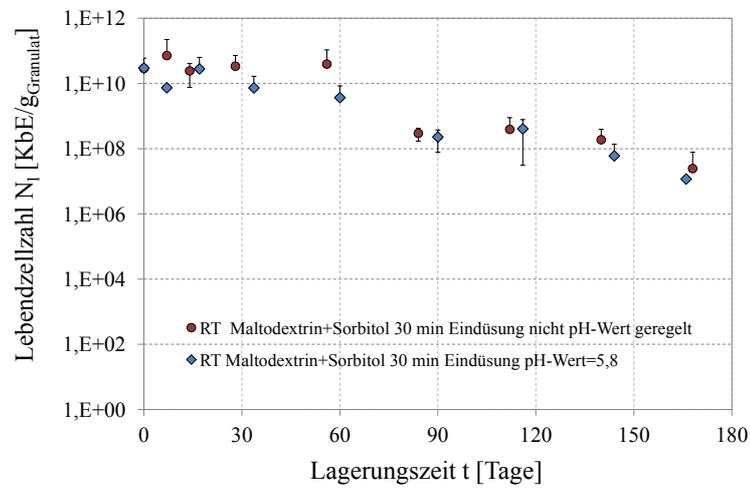
Aus der Tabelle 5.9 geht hervor, dass sich keine Unterschiede in den Wasseraktivitäten und -gehalten nach der Trocknung für die durchgeführten Experimente ergeben. Demnach kann die höhere Viabilität für *L. plantarum* auf die Stressinduktion während der Fermentation durch die pH-Wert Regelung zurückgeführt werden. Bauer et al. (2012) beobachteten nach der Vakuumtrocknung von *L. paracasei* Ähnliches. Jedoch stellten sie fest, dass im Falle der Trocknung pH-Wert geregelter *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Zellen die Viabilität geringer

war. Somit wird deutlich, dass es keine Vereinheitlichung für Viabilitätsangaben nach der Trocknung in Abhängigkeit von der pH-Wert Regelung während der Fermentation gibt. Vielmehr muss für jeden Bakterienstamm der Einfluss der pH-Wert Regelung während der Fermentation auf die Überlebensrate nach der Trocknung überprüft werden.

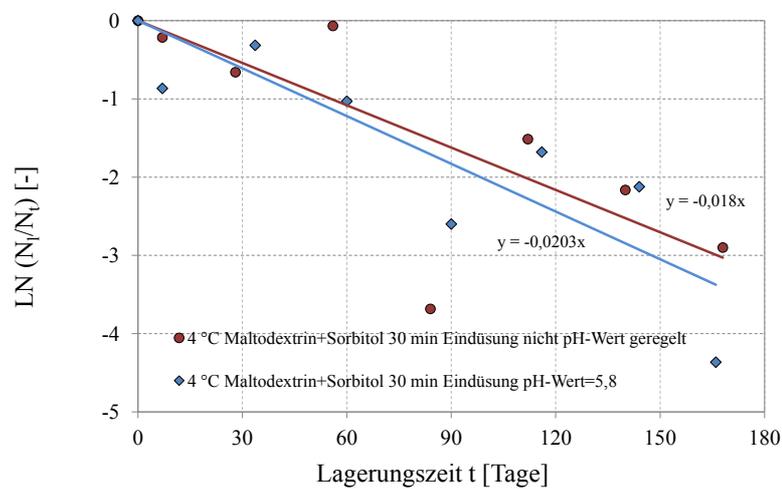
Für die Untersuchung des Einflusses der Änderung der Fermentationsbedingungen auf die Lagerstabilität von *L.plantarum* werden wiederholt Lagerungsexperimente bei 4 °C und Raumtemperatur über einen Zeitraum von sechs Monaten durchgeführt. Bei der Darstellung werden erneut die Verläufe der Lebendzellzahlen  $N_t$  von *L.plantarum* in KbE/g Granulat in den Abbildungen 5.46 und 5.47 gezeigt. Zusätzlich werden für die Bestimmung der Inaktivierungskonstanten der natürliche Logarithmus der Lebendzellzahlen bei 4 °C und Raumtemperatur gebildet und nochmals aus den Regressionsgeraden der  $k_t$ -Wert abgelesen. Die Verläufe dazu sind in den Abbildungen 5.48 und 5.49 zu sehen.



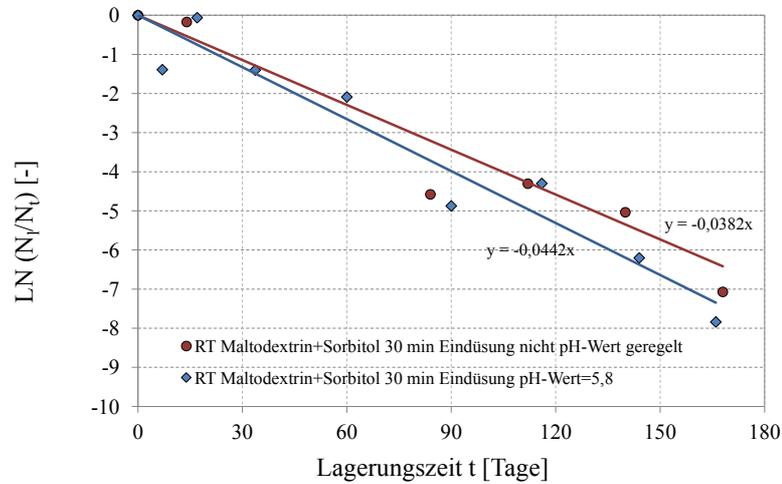
**Abbildung 5.46:** Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Lebendzellzahl  $N_t$  in KbE/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten *L.plantarum* Zellen aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen



**Abbildung 5.47:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Lebendzellzahl  $N_t$  in Kbe/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten *L.plantarum* Zellen aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen



**Abbildung 5.48:** Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von wirbelschichtgetrockneten *L.plantarum* Zellen aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen



**Abbildung 5.49:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von wirbelschichtgetrockneten *L.plantarum* Zellen aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen

Aus den Abbildungen 5.46 und 5.47 geht hervor, dass die Lagerstabilität von *L.plantarum* bei 4 °C unabhängig von den geänderten Fermentationsbedingungen bei beiden Versuchsreihen allmählich abnimmt, jedoch bei Raumtemperatur ein Unterschied in den Lebendzellzahlen erkennbar ist. Die bioaktiven Granulate weisen bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C keinen Unterschied in den Wassergehalten zu dem Anfangswert auf. Gleiches trifft auf die Wasseraktivität zu, die sich nach sechs Monaten geringfügig von  $a_w = 0,14 \pm 0,01$  auf  $a_w = 0,15 \pm 0,01$  erhöht. Im Falle der Lagerung bei Raumtemperatur können deutlichere Änderungen, sowohl bei der Wasseraktivität als auch bei dem Wassergehalt, beobachtet werden. Nach sechs Monaten wird hier ein Wassergehalt von  $X_e = 6,1 \pm 0,1$  % festgestellt. Diese Änderung trifft auch auf die Wasseraktivität zu, welche von  $a_w = 0,14 \pm 0,01$  auf  $a_w = 0,42 \pm 0,01$  ansteigt. Die Bestimmung der Inaktivierungskonstanten  $k_I$  aus den Regressionsgeraden führte im Falle der Lagerung bei 4 °C zu einem  $k_I$ -Wert von  $k_{pH \text{ geregelt}} = 0,020 \pm 0,011 \text{ Tage}^{-1}$ . Für die Lagerung bei Raumtemperatur wurde ein  $k_I$ -Wert von  $k_{pH \text{ geregelt}} = 0,044 \pm 0,019 \text{ Tage}^{-1}$  ermittelt. Zusammenfassend werden in der Tabelle 5.10 die ermittelten Größen mit den Ergebnissen aus den Trocknungsversuchen von nicht pH-Wert geregelten *L.plantarum* Zellen aus dem Abschnitt 5.4.1 gegenübergestellt.

**Tabelle 5.10:** Vergleich der Wassergehalte, Wasseraktivitäten und Inaktivierungskonstanten von *L.plantarum* aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C und Raumtemperatur nach sechs Monaten

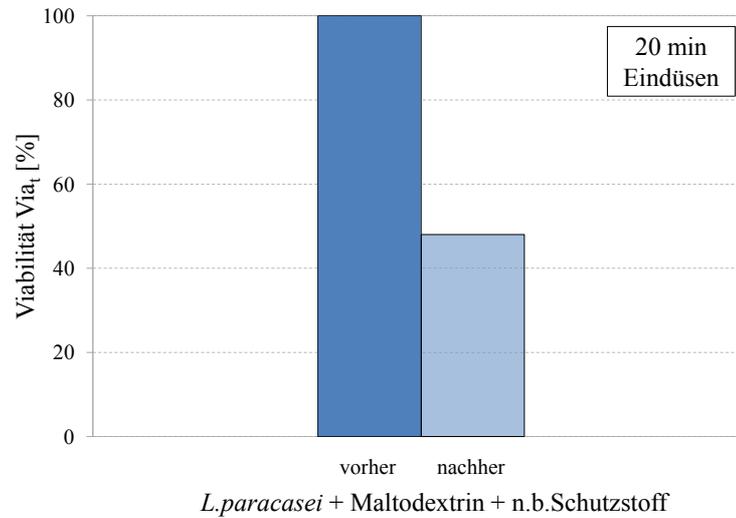
Temperatur	pH-Wert geregelte Fermentation	$X_e$ [%]	$a_w$ [-]	$k_l$ [Tage <sup>-1</sup> ]
4 °C	nein	$4,8 \pm 0,4$	$0,14 \pm 0,01$	$0,018 \pm 0,005$
	5,8	$5,1 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,01$	$0,020 \pm 0,011$
RT	nein	$6,1 \pm 0,8$	$0,27 \pm 0,12$	$0,038 \pm 0,009$
	5,8	$6,1 \pm 0,1$	$0,42 \pm 0,01$	$0,044 \pm 0,019$

Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass die Trocknung von *L.plantarum* aus pH-Wert geregelten Fermentationen zu höheren Viabilitäten führt. Jedoch ergeben sich während der Lagerung Unterschiede in den Lebendzellzahlverläufen. Hierbei weisen die aus der pH-Wert Regelung stammenden Bakterien einen größeren Viabilitätsverlust nach sechsmonatiger Lagerung auf. Demnach könnte es, wie eingangs im Kapitel 2 beschrieben, während der Fermentation durch den pH-Wert Abfall zur Bildung von Stressproteinen kommen, die wiederum die Stresstoleranz bei sich ändernden Umgebungsbedingungen erhöhen.

## 5.6 Übertragbarkeit ermittelter Prozessgrößen auf die Granulierung von *L.paracasei*

Für die Überprüfung der Anwendbarkeit der ermittelten Prozessparameter aus den zuvor durchgeführten Wirbelschichttrocknungsexperimenten von *L.plantarum* wird als weiterer milchsäureproduzierender Bakterienstamm, *L.paracasei*, in der Wirbelschicht getrocknet. Die Fermentation von *L.paracasei* erfolgte bei der Danisco GmbH und wurde im Kapitel 3 erläutert. Darüber hinaus werden auch die Angaben zur Biotrockenmassekonzentration von der Danisco GmbH bezogen. Diese beträgt nach der Fermentation  $c_{BTM} = 8,7 \text{ g/l}$ . Die Vorbereitung und Trocknung von *L.paracasei* wird analog zu den vorherigen Experimenten, unter Verwendung der Prozessparameter aus der Tabelle 5.2, durchgeführt. Wiederholt werden die Experimente unter Nutzung des Trägermaterials Maltodextrin realisiert. Zudem wird auf die Zugabe von Sorbitol oder Trehalose verzichtet, da die Zugabe eines nicht bekannten Schutzstoffes bereits vor dem Transport durch Mitarbeiter der Danisco GmbH erfolgte. Es wird eine 90 g Bakteriensuspension, bestehend aus Bakterien und einer PBS-Lösung, mit einer Zellkonzentration von  $10^{10}$  KbE/ml, bei einer Gaseintrittstemperatur von 40 °C,  $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85 \text{ kg/h}$  und  $\dot{M}_{Spr} = 270 \text{ g/h}$  20 Minuten in die Wirbelschichtanlage eingedüst und zehn Minuten nachgetrocknet. Bei der Angabe und Darstellung der Überlebensraten wird sich erneut unter Berücksichtigung der Messunsicherheiten auf die minimal Erreichten bezogen und die Standardabweichung vom Mittelwert subtrahiert.

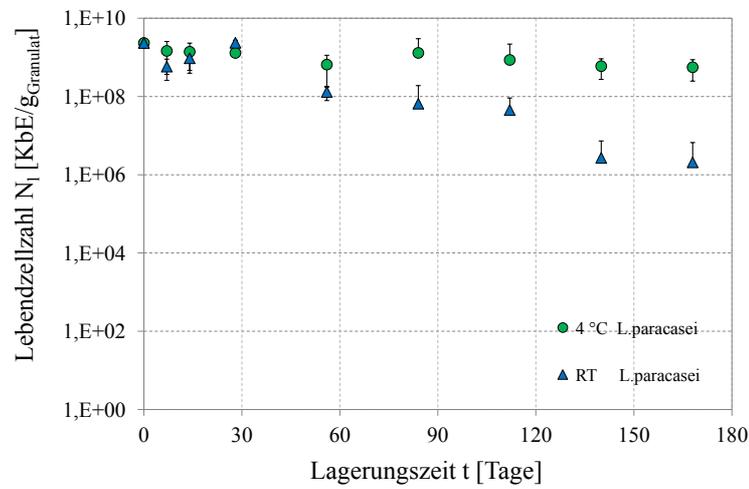
An die Wirbelschichtexperimente schließt sich erneut die Bestimmung der Überlebensrate nach der Trocknung von *L.paracasei* an. Diese ist in der Abbildung 5.50 dargestellt. Die Ergebnisse liegen in Dreifachbestimmung vor.



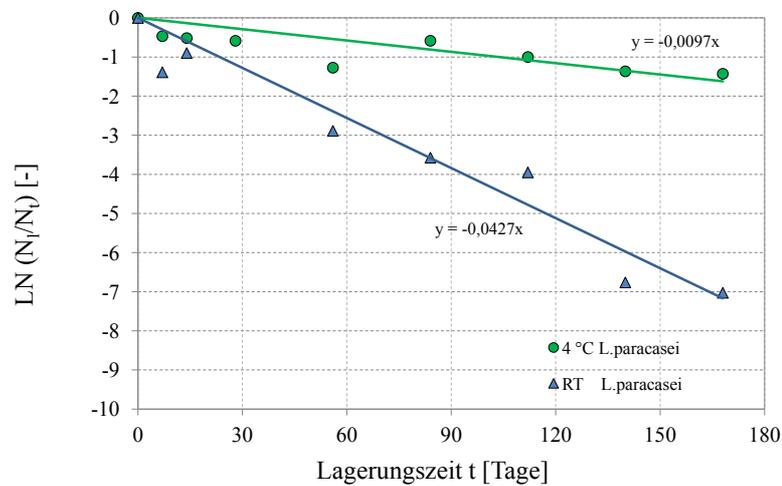
**Abbildung 5.50:** Viabilität von *L.paracasei* vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial sowie eines firmeninternen Schutzstoffes bei einer Eindüsenzeit von 20 Minuten,  $\vartheta_{ein} = 40\text{ °C}$ ,  $p_{spr} = 4\text{ bar}$ ,  $\dot{M}_{Spr} = 270\text{ g/h}$  und  $\dot{M}_{LMalto} = 85\text{ kg/h}$ . Die Nachtrocknungszeit beträgt zehn Minuten ( $n = 3$ )

Aus der Abbildung 5.50 geht hervor, dass die zuvor für *L.plantarum* ermittelten Prozessgrößen problemlos auf einen weiteren Bakterienstamm übertragen werden können. Auch hier werden bei Anwendung von Maltodextrin und kurzen Prozesszeiten hohe Viabilitäten nach der Trocknung im Größenbereich von 48 % erzielt. Die bioaktiven Granulate weisen nach der Trocknung Wassergehalte und Wasseraktivitäten von  $X_0 = 5,0 \pm 0,1\text{ %}$  beziehungsweise  $a_w = 0,15 \pm 0,03$  auf.

Wiederholt wird die Lagerstabilität von *L.paracasei* bei Raumtemperatur und  $4\text{ °C}$  über einen Zeitraum von sechs Monaten untersucht. Abermals werden dabei die Verläufe der Lebendzellzahlen in KbE/g und der natürliche Logarithmus der Lebendzellzahlen über die Lagerdauer bei den unterschiedlichen Temperaturen gezeigt. Diese Darstellungen sind in den Abbildung 5.51 und 5.52 visualisiert.



**Abbildung 5.51:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur und 4 °C über sechs Monate: Lebendzellzahlen  $N_i$  in KbE/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten *L.paracasei* Zellen



**Abbildung 5.52:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur und 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von wirbelschichtgetrockneten *L.paracasei* Zellen

In der Abbildung 5.51 ist zu erkennen, dass die Verläufe der Lebendzellzahlen bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen voneinander abweichen. Beginnend mit einer Lebendzellzahlkonzentration von ca.  $10^9$  KbE/g am ersten Tag verändert sich diese bei einer

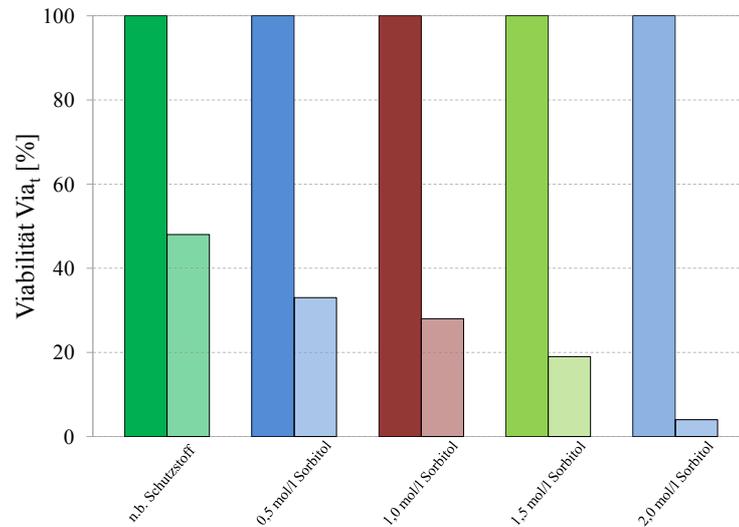
Lagerungs-temperatur von 4 °C bis zum Ende des Experimentes nur geringfügig und erreicht nach 168 Tagen eine Lebendzellzahlkonzentration von über  $10^8$  KbE/g. Die Lagerung bei Raumtemperatur hat einen stärkeren Einfluss auf den Verlust der Lebendzellzahl. In diesem Fall sinkt jene bis zum Ende des Experimentes auf ca.  $10^6$  KbE/g. Die Untersuchungen zur Bestimmung der Wassergehalte und -aktivitäten zeigen auch hier Unterschiede in Abhängigkeit von den Lagerungstemperaturen. Nach 168 Tagen Lagerung bei 4 °C weichen die Wassergehalte und -aktivitäten unerheblich von den Ausgangswerten ab und betragen  $X_e = 5,0 \pm 0,2\%$  und  $a_w = 0,16 \pm 0,02$ . Hingegen lässt sich bei Raumtemperatur ein Anstieg auf  $X_e = 6,5 \pm 0,4\%$  und  $a_w = 0,35 \pm 0,11$  beobachten.

Die Bestimmung der Inaktivierungskonstanten, zu sehen in der Abbildung 5.52, wird mit Hilfe der Regressionsgeraden realisiert. Für die Lagerung bei 4 °C wird eine Inaktivierungskonstante von  $k_{4^\circ C} = 0,010 \pm 0,012 \text{ Tage}^{-1}$  ermittelt. Im Gegensatz dazu erhöht sich diese im Fall der Lagerung bei Raumtemperatur auf  $k_{RT} = 0,043 \pm 0,019 \text{ Tage}^{-1}$ .

Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass die für *L.plantarum* ermittelten Prozessparameter für die Trocknung von *L.paracasei* genutzt werden können und bei Anwendung dieser ebenfalls hohe Viabilitäten nach der Trocknung erreicht werden. Jedoch kommt es zu Unterschieden in der Lagerfähigkeit bei Raumtemperatur. Diese nimmt stärker ab, als es bei *L.plantarum* unter Verwendung von Maltodextrin und Sorbitol der Fall war. Demnach wird hier deutlich, welche Wichtigkeit die Wahl des Schutzstoffes hat und inwieweit dieser Einfluss auf die Viabilität während der Lagerung nimmt.

## 5.7 Variation der Schutzstoffkonzentration

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Schutzstoffkonzentrationen von Sorbitol auf die Zellviabilität und Lagerstabilität von *L.paracasei* werden weitere Trocknungsexperimente durchgeführt. Dafür werden den Bakterien verschiedene Massen an Sorbitol vor der Trocknung hinzugegeben. Es wird analysiert, ob höhere Schutzstoffkonzentrationen mit einem besseren Schutz der Zellen einhergehen und ob dadurch höhere Viabilitäten von *L.paracasei* nach der Trocknung beziehungsweise während der Lagerung erzielt werden. Bei den Zellen handelt es sich nach wie vor um die von der Danisco GmbH bezogenen. Diese wurden im Voraus mit unbekanntem, firmeninternen Zellschutzstoff nach der Fermentation behandelt. Neben dem bereits vorhandenen, unbekanntem Schutzstoff wird in den nachfolgenden Experimenten Sorbitol eingesetzt. Dieser wird den Zellen direkt vor der Trocknung in den jeweiligen Schutzstoffkonzentrationen von 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 mol/l hinzugegeben. Als Prozessparameter dienen erneut die bereits bekannten Parameter aus der Tabelle 5.2. Analog zu den bisherigen Experimenten wird die Überlebensrate nach der Trocknung von *L.paracasei* ermittelt. Die Abbildung 5.53 zeigt alle Viabilitäten aus der Versuchsreihe unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Schutzstoffkonzentrationen an Sorbitol. Die ermittelten Lebendzellzahlen vor der Trocknung werden als 100 % dargestellt. Die sich nach der Trocknung ergebenden Lebendzellzahlen werden in Anbetracht der Messunsicherheiten auf die jeweiligen Lebendzellzahlen vor der Trocknung bezogen.



**Abbildung 5.53:** Viabilität von *L. paracasei* vor und nach der Wirbelschichttrocknung bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial sowie des firmeninternen Schutzstoffes und der jeweiligen Sorbitolkonzentrationen von 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 mol/l bei  $t = 20$  min,  $\vartheta_{ein} = 40$  °C,  $p_{spr} = 4$  bar,  $\dot{M}_{Spr} = 270$  g/h und  $\dot{M}_{L, Malto} = 85$  kg/h mit einer Nachtrocknungszeit von zehn Minuten

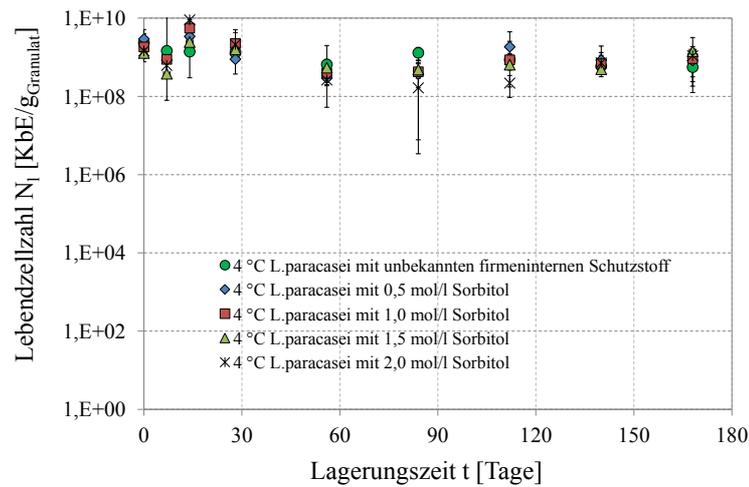
In der Abbildung 5.53 ist zu erkennen, dass die Viabilitäten mit zunehmender Sorbitolkonzentration sinken. Zur besseren Übersicht werden die nach der Trocknung ermittelten Viabilitäten mit den zugehörigen Wassergehalten und -aktivitäten in der Tabelle 5.11 gezeigt.

**Tabelle 5.11:** Einfluss von unterschiedlichen Sorbitolkonzentrationen auf die Viabilität, den Wassergehalt und die Wasseraktivität nach der Wirbelschichttrocknung von *L. paracasei* bei einer Eindüsungzeit von 20 Minuten und einer Nachtrocknungszeit von zehn Minuten bei Verwendung von Maltodextrin als Trägermaterial

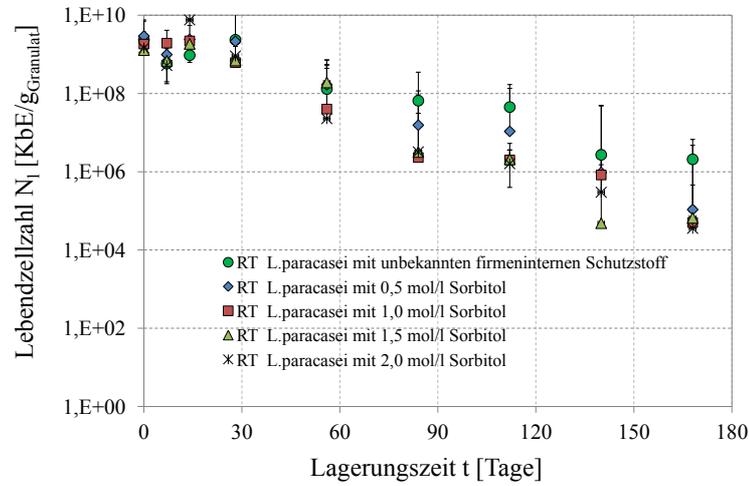
Schutzstoffkonzentration [mol/l]	$Via_t$ [%]	$X_a$ [%]	$a_w$ [-]
n.b. firmenintern	48	$5,0 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,03$
firmenintern+0,5 Sorbitol	33	$5,0 \pm 0,3$	$0,18 \pm 0,04$
firmenintern+1,0 Sorbitol	28	$5,3 \pm 0,3$	$0,21 \pm 0,05$
firmenintern+1,5 Sorbitol	19	$5,6 \pm 0,2$	$0,22 \pm 0,05$
firmenintern+2,0 Sorbitol	4	$5,7 \pm 0,1$	$0,22 \pm 0,02$

Der Tabelle 5.11 kann entnommen werden, dass sich die Wassergehalte und -aktivitäten nur geringfügig voneinander unterscheiden. Es ist eine Tendenz erkennbar, dass mit ansteigender Schutzstoffkonzentration der Wassergehalt sowie die Wasseraktivität zu-, jedoch die Viabilitäten im gleichen Maße abnehmen.

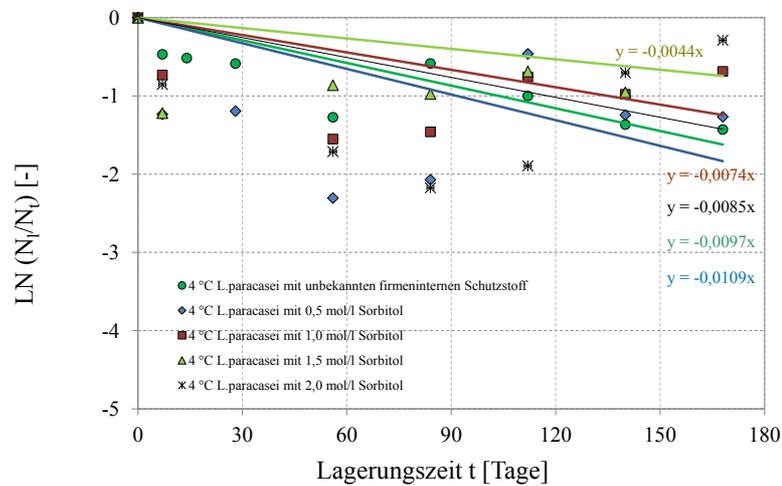
Für die Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Schutzstoffkonzentrationen auf die Lagerstabilität von *L.paracasei* werden abermals, analog zu den Experimenten zuvor, Lagerungsversuche bei 4 °C und Raumtemperatur durchgeführt. Erneut erfolgt die Darstellung der Ergebnisse als Lebendzellzahlverlauf in KbE/g und als natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen in Anbetracht der jeweiligen Lagertemperaturen über eine Dauer von 168 Tagen. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 5.54, 5.55, 5.56 und 5.57 veranschaulicht.



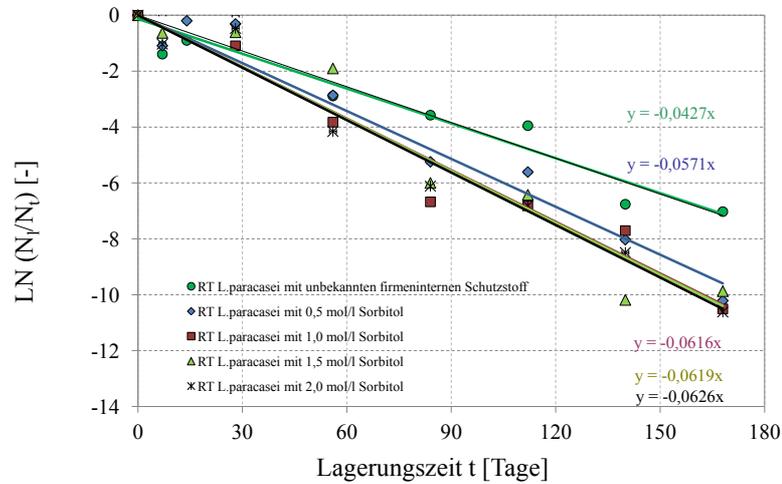
**Abbildung 5.54:** Lagerungsexperiment bei 4 °C über sechs Monate unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen: Lebendzellzahlen  $N_l$  in KbE/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten *L.paracasei* Zellen



**Abbildung 5.55:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen: Lebendzellzahlen  $N_l$  in KbE/g Granulat von wirbelschichtgetrockneten *L.paracasei* Zellen



**Abbildung 5.56:** Lagerungsexperiment unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen bei 4 °C über sechs Monate: Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen  $\ln(N_l/N_0)$  [-] auf der y-Achse gegen Lagerungszeit  $t$  [Tage] auf der x-Achse



**Abbildung 5.57:** Lagerungsexperiment bei Raumtemperatur über sechs Monate unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen : Natürlicher Logarithmus der Lebendzellzahlen von wirbelschichtgetrockneten *L.paracasei* Zellen

In den Abbildungen 5.54 und 5.55 ist zu erkennen, dass sich die Verläufe der Lebendzellzahlen in Abhängigkeit von der Lagertemperatur unterscheiden. Einerseits zeigen die Lebendzellzahlen bei 4 °C über die gesamte Lagerdauer unabhängig von der Schutzstoffkonzentration einen nahezu konstanten Verlauf. Andererseits lässt sich bei Raumtemperatur eine Änderung der Verläufe der Lebendzellzahlen feststellen. Mit zunehmender Lagerdauer sinkt die Anzahl der lebenden Zellen kontinuierlich von ca.  $10^9$  KbE/g auf  $10^5$  KbE/g bis  $10^4$  KbE/g ab. Bezüglich der unterschiedlichen Schutzstoffkonzentrationen ergeben sich nahezu keine Unterschiede in den Verläufen. Lediglich die Lebendzellzahlen aus den Experimenten ohne Zugabe von Sorbitol bilden dabei eine Ausnahme. Hierbei ist eine geringere Abnahme der Lebendzellzahlen von  $10^9$  KbE/g auf ca.  $10^6$  KbE/g erkennbar. Demnach lässt sich vermuten, dass die Zugabe eines weiteren Schutzstoffes nicht den gewünschten schützenden Effekt mit sich bringt. Vielmehr wird der Eindruck gewonnen, dass sich die Wirkungen der beiden Schutzstoffe gegenseitig neutralisieren.

Aus den Regressionsgeraden in den Abbildungen 5.56 und 5.57 werden abermals die Inaktivierungskonstanten von *L.paracasei* im Falle der Lagerung bei 4 °C und Raumtemperatur bestimmt. Zur besseren Übersicht sind alle nach Beendigung der Lagerungsexperimente ermittelten Wassergehalte, -aktivitäten und Inaktivierungskonstanten zusammengefasst in der Tabelle 5.12 aufgelistet.

**Tabelle 5.12:** Vergleich der Wassergehalte, Wasseraktivitäten und Inaktivierungskonstanten von *L.paracasei* aus den Lagerungsexperimenten bei 4 °C und Raumtemperatur nach sechs Monaten

Temperatur	Schutzstoffkonz. [mol/l]	$X_e$ [%]	$a_w$ [-]	$k_l$ [Tage <sup>-1</sup> ]
4 °C	firmenintern	5,0 ± 0,2	0,16 ± 0,02	0,010 ± 0,012
	firmenintern + 0,5 Sorbitol	5,0 ± 0,3	0,18 ± 0,03	0,011 ± 0,005
	firmenintern + 1,0 Sorbitol	5,4 ± 0,3	0,22 ± 0,01	0,007 ± 0,014
	firmenintern + 1,5 Sorbitol	5,7 ± 0,1	0,22 ± 0,01	0,004 ± 0,004
	firmenintern + 2,0 Sorbitol	5,7 ± 0,1	0,22 ± 0,02	0,009 ± 0,002
RT	firmenintern	6,5 ± 0,4	0,35 ± 0,11	0,043 ± 0,019
	firmenintern + 0,5 Sorbitol	5,3 ± 0,6	0,24 ± 0,10	0,057 ± 0,011
	firmenintern + 1,0 Sorbitol	5,9 ± 0,4	0,31 ± 0,09	0,062 ± 0,010
	firmenintern + 1,5 Sorbitol	5,7 ± 0,1	0,28 ± 0,02	0,062 ± 0,003
	firmenintern + 2,0 Sorbitol	5,8 ± 0,1	0,27 ± 0,04	0,063 ± 0,008

In der Tabelle 5.12 ist zu erkennen, dass sich bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C die Wasseraktivitäten und -gehalte der bioaktiven Granulate im Vergleich zum Ausgangswert nur geringfügig ändern. Zudem werden niedrige Inaktivierungskonstanten von *L.paracasei* über die Lagerungszeit ermittelt. Im Gegensatz dazu steigen die Inaktivierungskonstanten, Wasseraktivitäten und Wassergehalte bei Raumtemperatur an. Den größten Wassergehalt weisen die bioaktiven Granulate auf, die ohne zusätzliche Zugabe von Sorbitol hergestellt wurden. Hierbei wird auch die höchste Wasseraktivität mit einem Wert von 0,35 gemessen. Trotz der höchsten erreichten Wassergehalte und -aktivitäten wird in diesem Experiment jedoch das lagerfähigste Granulat erzeugt. Da der von der Danisco GmbH verwendete Schutzstoff unbekannt ist, lässt sich keine Aussage über dessen Interaktion mit Sorbitol treffen. Jedoch sollte zukünftig beim Vorhandensein dieses Schutzstoffes auf die Zugabe von Sorbitol verzichtet werden.

## Kapitel 6

# Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Niedertemperaturgranulierung von prokaryotischen Mikroorganismen. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, mit dessen Hilfe getrocknete Starterkulturen schonend und innerhalb einer kurzen Zeit von 30 Minuten hergestellt werden können. Im Vergleich zur Gefriertrocknung, welche hierfür in der Regel Anwendung findet, ist dies eine deutlich günstigere und schnellere Alternative. Mit der Wirbelschichttrocknung lassen sich Granulate herstellen, die sich nach der Trocknung sowohl durch eine hohe Bakterienviabilität in Höhe von 28 bis 64 % als auch nach einer Lagerungszeit von mindestens sechs Monaten durch eine große Keimzahl in Höhe von  $10^7$  -  $10^9$  KbE/g Granulat auszeichnen. Neben den hohen Lebendzellzahlen werden durch den Einsatz von Trägermaterialien Bakterien-Granulate erzeugt, die zudem den Vorteil der Rieselfähigkeit mit sich bringen. Dadurch wird das Handling bei der späteren Abfüllung beziehungsweise Dosierung erleichtert.

Für die Erzeugung der bioaktiven Granulate wurden im Rahmen der Arbeit eine Reihe von Wirbelschichttrocknungsexperimenten durchgeführt, bei denen der Einfluss von Prozessparametern, Trägermaterialien und Schutzstoffen untersucht wurde. Als Trägermaterialien und Schutzstoffe werden ausschließlich jene verwendet, die in der Lebensmittelindustrie zugelassen und zudem wasserlöslich sind. Dazu finden als Trägermaterialien Zuckerpellets, Laktose sowie Maltodextrin und als Schutzstoffe Trehalose sowie Sorbitol Anwendung. Als Modellorganismus wird der Milchsäurebakterienstamm *L.plantarum* verwendet. Im Rahmen der Versuche stellte sich heraus, dass die Verwendung des Trägermaterials Maltodextrin die höchsten Überlebensraten nach der Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum* zwischen 28 bis 64 % nach sich zieht.

Die Durchführung der Niedertemperaturgranulierung von *L.plantarum* erfolgt bei niedrigen Prozesstemperaturen, in Höhe von 40 °C. Diese liegt innerhalb der natürlichen Wachstumsgrenze von *L.plantarum* und verringert somit das Risiko von thermischen Belastungen. Die Bakteriensuspension wird mit einer Eindüsungsrate von 270 g/h und einem Sprühdruk von 4 bar eingedüst. Als Gasmassenstrom für Maltodextrin DE 20 wurden 85 kg/h eingestellt. Dieser variiert in Abhängigkeit vom Trägermaterial. Aus den durchgeführten Experimenten konnten die Erkenntnisse gewonnen werden, dass sich die Überlebensrate bei kürzeren Prozesszeiten nach der Trocknung erhöht. Dabei führten

Eindüsenzeiten von 20 bis 40 Minuten zu geringeren Verlusten der Lebendzellzahl als es bei 60 und 180 Minuten der Fall war. Zudem ergaben die Versuche, dass bei einer Eindüsenzeit von 20 Minuten die Viabilitäten nach der Trocknung unter Verwendung des Schutzstoffes Sorbitol keinen Unterschied zu jenen zeigen, die ohne Zugabe des Schutzstoffes getrocknet wurden. Demnach zieht die Zugabe des Schutzstoffes während der Trocknung keine Wirkung beziehungsweise Verbesserung der Viabilität nach sich.

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Inaktivierung von *L.plantarum* während der Wirbelschichttrocknung mit Hilfe eines gekoppelten Wirbelschichttrocknungs- und Inaktivierungsmodells beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde der Wärme- und Stoffübergang in der Wirbelschicht modelliert und die daraus berechneten Größen, wie Temperatur und Partikelfeuchte, an das Inaktivierungsmodell übergeben. Dabei wurde zum Einen deutlich, wie hoch der Einfluss der thermischen Inaktivierung und der Inaktivierung durch den Wasserentzug während der Trocknung war. Zum Anderen bestand im Zuge dessen die Möglichkeit, diese beiden Inaktivierungsformen getrennt voneinander zu betrachten. Diese Unterteilung gelingt durch die Ermittlung der Lebendzellzahlkonzentrationsänderung über die Partikelfeuchte bei gleichbleibender Temperatur  $(dA/dX)_T$  beziehungsweise über die Temperatur bei konstanter Partikelfeuchte  $(dA/dT)_X$ . Daraus ergaben sich die jeweiligen Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten, die für die Simulation des Viabilitätsverlustes während der Trocknung genutzt wurden. Anhand dieser Bestimmung stellte sich heraus, dass die Inaktivierung der Bakterien während der Trocknung bei den hier verwendeten Prozessparametern hauptsächlich durch den Wasserentzug erfolgte. Mit Hilfe des hier erzeugten Modells können zukünftig Viabilitätsverluste, welche im Rahmen von industriellen Trocknungen auftreten, in Abhängigkeit von den Wärme- und Stoffübergängen in der Wirbelschicht vorausberechnet werden.

Des Weiteren wurden von den hergestellten bioaktiven Granulaten Lagerungsexperimente bei 4 °C und Raumtemperatur über mindestens sechs Monate durchgeführt. Aus den Lagerungsexperimenten ging hervor, dass Temperaturen in Höhe von 4 °C keine Veränderungen in den Lebendzellzahlen, Wasseraktivitäten und Wassergehalten nach sich ziehen. Hingegen lassen sich bei Erhöhung auf Raumtemperatur andere Erkenntnisse gewinnen. Hierbei wurden höhere Wassergehalte und -aktivitäten ermittelt. Dies führte bei Zellen, die ohne Zugabe von Schutzstoffen getrocknet wurden, zu Viabilitätsverlusten. Bei Raumtemperatur erhöhten sich die Wassergehalte und -aktivitäten, jedoch ließ sich ein geringerer Viabilitätsverlust während der Lagerung bei den Granulaten feststellen, die mit Zellschutzstoffen versehen waren. Der Einsatz von Zellschutzstoffen verbesserte die Lagerfähigkeit von *L.plantarum* bei Raumtemperatur. Nach einer Lagerungszeit von sechs Monaten konnten Lebendzellzahlen in Höhe von  $10^7 - 10^9$  Kbe/g Granulat ermittelt werden.

Ein weiterer Aspekt in dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses veränderter Kultivierungsbedingungen auf die Viabilität von *L.plantarum* nach der Trocknung und Lagerung. Dabei wurden die Bakterien aus pH-Wert geregelten und nicht pH-Wert geregelten Fermentationen in der Wirbelschicht getrocknet. Aus diesen Versuchen ging hervor, dass durch die pH-Wert Regelung höhere Viabilitäten nach der Trocknung erreicht wurden, die Lebendzellzahlen jedoch bei der Lagerung, sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur, stärker abnahmen.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die für *L.plantarum* formulierten Prozessbedingungen für die Wirbelschichttrocknung auf einen anderen milchsäureproduzierenden Bakterienstamm übertragen und ähnlich hohe Überlebensraten erzielt werden können. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Prozessparameter problemlos auf die Trocknung von *L.paracasei* anwenden lassen. Es wurde eine Überlebensrate von 48 % ermittelt. Weiterhin wurden Untersuchungen durchgeführt, welche Auswirkungen höhere Schutzstoffkonzentrationen von Sorbitol auf die Viabilität nach der Trocknung und Lagerung mit sich bringen. In diesem Zusammenhang wurde der gegenläufige Effekt beobachtet, dass mit zunehmender Sorbitolkonzentration die Lebendzellzahl abnahm.

# Literaturverzeichnis

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*. *International Journal of Food Microbiology* 65:173–182.

Akbari H, Karimi K, Lundin M, Taherzadeh MJ (2012) Optimization of baker's yeast drying in industrial continuous fluidized bed dryer. *Food and Bioprocess Technology* 90:52–57.

Alpas H, Özilgen M, Faruk Bozoglu T, Katnas S (1996) Mathematical modeling of survival and weight loss of baker's yeast during drying. *Enzyme and Microbial Technology* 19:348–351.

Axelsson LT (1993) *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Baskakov A, Berg B, Vitt O, Filippovsky N, Kirakosyan V, Goldobin J, Maskaev V (1973) Heat transfer to objects immersed in fluidized beds. *Powder Technology* 8:273–282.

Bauer SAW, Schneider S, Behr J, Kulozik U, Foerst P (2012) Combined influence of fermentation and drying conditions on survival and metabolic activity of starter and probiotic cultures after low-temperature vacuum drying. *Journal of Biotechnology* .

Bayrock D, Ingledew WM (1997a) Fluidized bed drying of baker's yeast: Moisture levels, drying rates, and viability changes during drying. *Food Research International* 30:407–415.

Bayrock D, Ingledew WM (1997b) Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food Research International* 30:417–425.

Bhandari BR, Howes T (1999) Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering* 40:71–79.

Bhandari B, Datta N, Crooks R, Howes T, Rigby S (1997) A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. *Drying Technology* 15:2509–2525.

Billaud C, Adrian J (2003) Louis Camille Maillard. *Food Reviews International* 19:345–374.

Bischoff SC (2009) *Probiotika, Präbiotika und Synbiotika* Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.

- Bolla PA, De Los Angeles Serradell M, De Urreza PJ, De Antoni GL (2011) Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research* 78:15–22.
- Bouquerand PE, Maio S, Meyer F, Normand V (2008) Moisture stability of maltodextrin-based delivery systems. *Food Biophysics* 3:182–185.
- Branchenguide (2011) Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft. *Deutsche Molkerei Zeitung* p. 4.
- Brunauer S, Emmett PH, Teller E (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60:309–319.
- Bucio A, Hartemink R, Schrama JW, Verreth J, Rombouts FM (2005) Survival of lactobacillus plantarum 44a after spraying and drying in feed and during exposure to gastrointestinal tract fluids in vitro. *The Journal of General and Applied Microbiology* 51:221–227.
- Burgschweiger J (2000) Modellierung des statischen und dynamischen Verhaltens von kontinuierlich betriebenen Wirbelschichttrocknern. Dissertation, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P (2002) Survival of freeze-dried lactobacillus plantarum and lactobacillus rhamnosus during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters* 24:1587–1591.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P (2003) Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait* 83:203–210.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 14:835–847.
- Champagne CP, Gardner NJ, Roy D (2005) Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 45:61–84.
- Chen XD, Patel KC (2007) Microorganism inactivation during drying of small droplets or thin layer slabs a critical review of existing kinetics models and an appraisal of the drying rate dependent model. *Journal of Food Engineering* 82:1–10.
- Chua KJ, Chou SK (2003) Low-cost drying methods for developing countries. *Trends in Food Science Technology* 14:519–528.
- Churchill SW, Chu HH (1975) Correlating equations for laminar and turbulent free convection from a vertical plate. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 18:1323–1329.
- Chávez BE, Ledebøer AM (2007) Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology* 25:1193–1201.
- Collins MD, Phillips BA, Zannoni P (1989) Deoxyribonucleic acid homology studies of lactobacillus casei, lactobacillus paracasei sp. nov., subsp. paracasei and subsp. tolerans, and lactobacillus rhamnosus sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:105–108.

- Conrad PB, Miller DP, Cielenski PR, de Pablo JJ (2000) Stabilization and preservation of lactobacillus acidophilus in saccharide matrices. *Cryobiology* 41:17–24.
- Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C (2004) Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology* 96:1024–1039.
- Couchman PR, Karasz FE (1978) A classical thermodynamic discussion of the effect of composition on glass-transition temperatures. *Macromolecules* 11:117–119.
- Crowe LM, Reid DS, Crowe JH (1996) Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 71:2087–2093.
- Crowe LM (2002) Lessons from nature: The role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 131:505–513.
- Cunäus U, Peglow M, Tsotsas E, Metzger T (2008) Modelling of continuous fluidized bed drying using a population balance approach In *Proceedings of 16th International Drying Symposium, Vol. A*, pp. 456–462.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 23:130–135.
- DeAngelis M, Gobetti M (2004) Environmental stress responses in lactobacillus: A review. *Proteomics* 4:106–122.
- Debaste F, Halloin V, Bossart L, Haut B (2008) A new modeling approach for the prediction of yeast drying rates in fluidized beds. *Journal of Food Engineering* 84:335–347.
- Desmond C, Stanton C, Fitzgerald GF, Collins K, Paul Ross R (2001) Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 11:801–808.
- Downton GE, Flores-Luna JL, King CJ (1982) Mechanism of stickiness in hygroscopic, amorphous powders. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals* 21:447–451.
- Figura L (2004) *Lebensmittelphysik Physikalische Kenngrößen und Anwendung* Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Foerst P, Kulozik U, Schmitt M, Bauer S, Santivarangkna C (2012) Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium lactobacillus paracasei f19. *Food and Bioproducts Processing* 90:295–300.
- Fonseca F, Obert JP, Béal C, Marin M (2001) State diagrams and sorption isotherms of bacterial suspensions and fermented medium. *Thermochimica Acta* 366:167–182.
- Fonseca F, Passot S, Cunin O, Marin M (2004) Collapse temperature of freeze-dried lactobacillus bulgaricus suspensions and protective media. *Biotechnology Progress* 20:229–238.
- Fu N, Chen XD (2011) Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International* 44:1127–1149.

- G-Alegria E, López I, Ruiz JI, Sáenz J, Fernández E, Zarazaga M, Dizy M, Torres C, Ruiz-Larrea F (2004) High tolerance of wild lactobacillus plantarum and oenococcus oeni strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters* 230:53–61.
- Giraud E, Lelong B, Raimbault M (1991) Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of lactobacillus plantarum. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36:96–99.
- Glück B (1986) Zustands- und Stoffwerte: Wasser-Dampf-Luft, Verbrennungsrechnung. Verlag für Bauwesen, Berlin, Germany.
- Gnielinski V (1980) Wärme- und Stoffübertragung in Festbetten. *Chemie Ingenieur Technik* 52:228–236.
- Gordon M, Taylor JS (1952) Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. Part 1: Non-crystalline copolymers. *Journal of Applied Chemistry* 2:493–500.
- Groenewold H, Tsotsas E (1997) A new model for fluid bed drying. *Drying Technology* 15:1687–1698.
- Groenewold H, Tsotsas E (1999) Predicting apparent Sherwood numbers for fluidized beds. *Drying Technology* 17:1557–1570.
- Groenewold H (2004) Wirbelschichttrocknung mit indirekter Beheizung. Dissertation, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Haque MK, Roos YH (2004) Water sorption and plasticization behavior of spray-dried lactose/protein mixtures. *Journal of Food Science* 69:E384–E391.
- Higl B (2008) Bedeutung der Verfahrenstechnik und des Glaszustandes auf die Stabilität von Mikroorganismen während der Lyophilisierung und der Lagerung. Dissertation, Technische Universität München.
- Higl B, Kurtmann L, Carlsen CU, Ratjen J, Först P, Skibsted LH, Kulozik U, Risbo J (2007) Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of lactobacillus paracasei ssp. paracasei freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress* 23:794–800.
- Holzapfel W, Schillinger U (2001) Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International* 35:109–116.
- Ihlow PT (2006) Beitrag zur atmosphärischen Wirbelschichtgefriertrocknung. Dissertation, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Johari GP, Hallbrucker A, Mayer E (1987) The glass-liquid transition of hyperquenched water. *Nature* 330:552–553.
- Jouppila K, Kansikas J, Roos YH (1997) Glass transition, water plasticization, and lactose crystallization in skim milk powder. *Journal of Dairy Science* 80:3152–3160.
- Jouppila K, Roos YH (1994) Glass transitions and crystallization in milk powders. *Journal of Dairy Science* 77:2907–2915.

- Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Tarchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stiekema W, Lankhorst RM, Bron PA, Hoffer SM, Groot MN, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Siezen RJ (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* wcfsl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1990–1995.
- Krauss R (1994) *Kapitel: Stoffwerte von Luft* VDI-Wärmeatlas Düsseldorf, Germany.
- Kurtmann L, Carlsen CU, Skibsted LH, Risbo J (2009) Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (1a-5): Influence of physical state on bacterial survival during storage. *Biotechnology Progress* 25:265–270.
- Labuza TP, Dugan LR (1971) Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology* 2:355–405.
- Lievense LC (1991) The inactivation of *Lactobacillus plantarum* during drying. Dissertation, Wageningen University, The Netherlands.
- Lievense LC, van't Riet K (1994) *Convective drying of bacteria*, Vol. 51 of *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, chapter 3, pp. 71–89 Springer Berlin Heidelberg.
- Linders LJM, Meerdink G, van't Riet K (1997) Effect of growth parameters on the residual activity of *Lactobacillus plantarum* after drying. *Journal of Applied Microbiology* 82:683–688.
- Linders LJM, de Jong GIW, Meerdink G, van't Riet K (1997a) Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. *Journal of Food Engineering* 31:237–250.
- Linders LJM, Wolkers WF, Hoekstra FA, van't Riet K (1997b) Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology* 35:31–40.
- Lindgren S, Dobrogosz WJ (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 87:149–163.
- Liou JK (1982) An approximate method for nonlinear diffusion applied to enzyme inactivation during drying. Dissertation, Landbouwhogeschool te Wageningen, The Netherlands.
- Lorca GL, de Valdez GF (2001) A low-ph-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* crl 639. *Current Microbiology* 42:21–25.
- Lucas K, Luckas M (2002) *Berechnungsmethoden für Stoffeigenschaften*, chapter 4, pp. 107–523 VDI-Buch. Springer Berlin Heidelberg.
- Martin H (2013) *M5 Wärmeübergang in Wirbelschichten*, chapter 100, pp. 1489–1498 VDI-Buch. Springer Berlin Heidelberg.
- Masters K (1979) *Spray drying handbook* George Godwin Ltd., London, United Kingdom.
- Meerdink G, Riet K (1995) Prediction of product quality during spray drying. *Food and Bioproducts Processing* 73:165–70.

- Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, Daly C, Ross RP (2008) Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* 106:1406–1416.
- Mille Y, Girard JP, Beney L, Gervais P (2005) Air drying optimization of *saccharomyces cerevisiae* through its water glycerol dehydration properties. *Journal of Applied Microbiology* 99:376–382.
- Mille Y, Obert JP, Beney L, Gervais P (2004) New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. *Biotechnol. Bioeng.* 88:71–76.
- Morelli L (2000) In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1:59–67.
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G (2006) Preservation of micro-organisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods* 66:183–193.
- Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM (2010) *Biotechnology of lactic acid bacteria* Wiley-Blackwell.
- Mujumdar AS (2007) *Handbook of industrial drying* CRC Press, Boca Raton, USA.
- Palmfeldt J, Hahn-Hägerdal B (2000) Influence of culture pH on survival of *lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology* 55:235–238.
- Passot S, Cenard S, Douania I, Tréléa IC, Fonseca F (2012) Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chemistry* 132:1699–1705.
- Peglow M (2005) Beitrag zur Modellbildung von eigenschaftsverteiltern dispersen Systemen am Beispiel der Wirbelschicht-Sprühagglomeration. Dissertation, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Peighambaroust SH, Golshan Tafti A, Hesari J (2011) Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science and Technology* 22:215–224.
- Poirier I, Maréchal PA, Richard S, Gervais P (1999) *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *Journal of Applied Microbiology* 86:87–92.
- Robinson R (1983) Starter cultures for milk and meat processing. *Biotechnology* 3:192–202.
- Roos Y (1995) Characterization of food polymers using state diagrams. *Journal of Food Engineering* 24:339–360.
- Roos Y, Karel M (1991a) Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions. *International Journal of Food Science and Technology* 26:553–566.
- Roos Y, Karel M (1991b) Water and molecular weight effects on glass transitions in amorphous carbohydrates and carbohydrate solutions. *Journal of Food Science* 56:1676–1681.
- Roos Y (1987) Effect of moisture on the thermal behavior of strawberries studied using differential scanning calorimetry. *Journal of Food Science* 52:146–149.

- Roos Y (1993) Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates. *Carbohydrate Research* 238:39–48.
- Rosenplenter K, von Rymon Lipinski GW, Nöhle U (2007) *Handbuch Süßungsmittel* Behr's Verlag Ha, Deutschland.
- Roser B (1991) Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science Technology* 2:166–169.
- Santivarangkna C, Higl B, Foerst P (2008a) Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiol.* 25:429–41.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol. Prog.* 23:302–15.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P (2008b) Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J. Appl. Microbiol.* 105:1–13.
- Schirmer R (1938) Die Diffusionszahl von Wasserdampf-Luft-Gemischen und die Verdampfungsgeschwindigkeit Dissertation, Technische Hochschule München, Germany.
- Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Levin-Brener L, Gurevich N, Shimoni E (2010) Microencapsulation of lactobacillus paracasei by spray freeze drying. *Food Research International* 43:193–202.
- Silva J, Carvalho AS, Ferreira R, Vitorino R, Amado F, Domingues P, Teixeira P, Gibbs PA (2005) Effect of the pH of growth on the survival of lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus to stress conditions during spray-drying. *Journal of Applied Microbiology* 98:775–782.
- Slade L, Levine H, Reid DS (1991) Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 30:115–360.
- Strasser S, Neureiter M, Gepl M, Braun R, Danner H (2009) Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 107:167–177.
- Tanzer J, Thompson A, Lang C, Cooper B, Hareng L, Gamer A, Reindl A, Pompejus M (2010) Caries inhibition by and safety of lactobacillus paracasei dsmz16671. *Journal of Dental Research* 89:921–926.
- Teixeira PC, Castro MH, Malcata FX, Kirby RM (1995) Survival of lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus following spraydrying. *Journal of Dairy Science* 78:1025–1031.
- Tonon RV, Baroni AF, Brabet C, Gibert O, Pallet D, Hubinger MD (2009) Water sorption and glass transition temperature of spray dried açai (euterpe oleracea mart.) juice. *Journal of Food Engineering* 94:215–221.
- Tsaousi K, Dimitrellou D, Koutinas AA (2008) Low-temperature thermal drying of saccharomyces cerevisiae starter culture for food production. *Food Chemistry* 110:547–553.

- Tsotsas E (1994) From single particle to fluid bed drying kinetics. *Drying Technology* 12:1401–1426.
- Uhlemann H, Mörl L (2000) *Wirbelschicht-Srühgranulation* Springer, Berlin, Germany.
- Van Meel DA (1958) Adiabatic convection batch drying with recirculation of air. *Chemical Engineering Science* 9:36–44.
- Wagner W, Kruse A, Kurtzschmar HJ (1998) *Properties of water and steam: The industrial standard IAPWS-IF97 for the thermodynamic properties and supplementary equations for other properties: Tables based on these equations* Springer, Berlin, Germany.
- Wang YC, Yu RC, Chou CC (2004) Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int. J. Food. Microbiol.* 93:209–17.
- Yamamoto S, Sano Y (1992) Drying of enzymes: Enzyme retention during drying of a single droplet. *Chemical Engineering Science* 47:177–183.
- Zimmermann K (1987) Einflussparameter und mathematische Modellierung der schonenden Trocknung von Starterkulturen. Dissertation, Technische Universität München, Germany.

# Anhang A

## Anhang

### A.1 Stoffwerte

#### A.1.1 Stoffwerte der trockenen Luft

##### Molare Masse

Quelle: Krauss (1994)

$$\tilde{M}_L = 28.96 \text{ kg/kmol} \quad (\text{A.1})$$

##### Spezifische Gaskonstante

Quelle: Krauss (1994)

$$R_L = 287.22 \text{ J/(kg K)} \quad (\text{A.2})$$

##### Dichte

$$\varrho_L = \frac{P\tilde{M}_L}{\tilde{R}T_L} = \frac{P}{R_L(273.14 \text{ K} + \vartheta)} \quad (\text{A.3})$$

Einheit:  $\text{kg/m}^3$

##### Spezifische Wärmekapazität

Quelle: Glück (1986)

$$c_{P,L} = A + B \cdot \vartheta + C \cdot \vartheta^2 + D \cdot \vartheta^3 \quad (\text{A.4})$$

$$A = +1006.256 \cdot 10^0$$

$$B = +2.120536 \cdot 10^{-2}$$

$$C = +4.180195 \cdot 10^{-4}$$

$$D = -1.521916 \cdot 10^{-7}$$

Einheit:  $\text{J/(kg K)}$

Gültigkeitsbereich:  $-20^\circ\text{C} \leq \vartheta \leq 200^\circ\text{C}$ ;  $P = 100000 \text{ Pa}$

Maximaler Fehler: 0.05%

**Wärmeleitfähigkeit**

Quelle: Glück (1986)

$$\lambda_L = A + B \cdot \vartheta + C \cdot \vartheta^2 + D \cdot \vartheta^3 \quad (\text{A.5})$$

$$A = +24.52110 \cdot 10^{-3}$$

$$B = +7.501414 \cdot 10^{-5}$$

$$C = -2.593344 \cdot 10^{-8}$$

$$D = +5.292884 \cdot 10^{-11}$$

Einheit:  $W/(m K)$ Gültigkeitsbereich:  $-20^\circ C \leq \vartheta \leq 200^\circ C; P = 100000 Pa$ 

Maximaler Fehler: 0.08%

**Dynamische Viskosität**

Quelle: Glück (1986)

$$\eta_L = A + B \cdot \vartheta + C \cdot \vartheta^2 + D \cdot \vartheta^3 \quad (\text{A.6})$$

$$A = +1.705568 \cdot 10^{-5}$$

$$B = +4.511012 \cdot 10^{-8}$$

$$C = -8.766234 \cdot 10^{-12}$$

$$D = -3.382035 \cdot 10^{-15}$$

Einheit:  $kg/(m s)$ Gültigkeitsbereich:  $-20^\circ C \leq \vartheta \leq 200^\circ C; P = 100000 Pa$ 

Maximaler Fehler: 0.6%

**Prandtl-Zahl**

$$Pr_L = \frac{\eta_L c_{p,L}}{\lambda_L} \quad (\text{A.7})$$

Einheit: –

**Kinematische Viskosität**

$$\nu_L = \frac{\eta_L}{\rho_L} \quad (\text{A.8})$$

Einheit:  $m^2/s$

### A.1.2 Stoffwerte von Wasser

#### Molare Masse

Quelle: Wagner et al. (1998)

$$\tilde{M}_w = 18.0153 \text{ kg/kmol} \quad (\text{A.9})$$

#### Spezifische Gaskonstante

Quelle: Wagner et al. (1998)

$$R_w = 461.519 \text{ J/(kg K)} \quad (\text{A.10})$$

#### Spezifische Verdampfungsenthalpie

Quelle: Glück (1986)

$$\Delta h_v = A + B \cdot \vartheta + C \cdot \vartheta^2 \quad (\text{A.11})$$

$$A = +2.5 \cdot 10^6$$

$$B = -2.0425 \cdot 10^3$$

$$C = -3.813 \cdot 10^0$$

Einheit:  $J/(kg)$

Gültigkeitsbereich:  $10^\circ C \leq \vartheta \leq 200^\circ C$

Maximaler Fehler: 0.3%

### A.1.3 Stoffwerte von Wasserdampf

#### Dichte

$$\varrho_D = \frac{P \tilde{M}_w}{\tilde{R} T_L} = \frac{P}{R_w (273.14 K + \vartheta)} \quad (\text{A.12})$$

Einheit:  $kg/m^3$

#### Spezifische Wärmekapazität

Quelle: Glück (1986)

$$c_{P,D} = A + B \cdot \vartheta + C \cdot \vartheta^2 + D \cdot \vartheta^3 \quad (\text{A.13})$$

$$A = +1.862 \cdot 10^3$$

$$B = +2.858485 \cdot 10^{-1}$$

$$C = +6.148483 \cdot 10^{-4}$$

$$D = -2.060606 \cdot 10^{-7}$$

Einheit:  $J/(kg K)$

Gültigkeitsbereich:  $25^\circ C \leq \vartheta \leq 400^\circ C$ ;  $100 \text{ Pa} \leq P \leq 1000 \text{ Pa}$

Maximaler Fehler: 0.06%

### Wärmeleitfähigkeit

Quelle: Glück (1986)

$$\lambda_D = A + B \cdot \vartheta + C \cdot \vartheta^2 + D \cdot \vartheta^3 \quad (\text{A.14})$$

$$A = +0.0170 \cdot 10^0$$

$$B = +5.698384 \cdot 10^{-5}$$

$$C = +1.297172 \cdot 10^{-7}$$

$$D = -9.131313 \cdot 10^{-11}$$

Einheit:  $W/(m K)$

Gültigkeitsbereich:  $25^\circ C \leq \vartheta \leq 400^\circ C$ ;  $100 Pa \leq P \leq 1000 Pa$

Maximaler Fehler: 0.14%

### Diffusionskoeffizient von Wasserdampf in Luft

Quelle: Schirmer (1938)

Quelle: Lucas and Luckas (2002)

$$D_{D,L} = \frac{0.01013 T^{1.75}}{P [(\Sigma \nu_w)^{1/3} (\Sigma \nu_L)^{1/3}]^2} \left( \frac{\tilde{M}_w + \tilde{M}_L}{\tilde{M}_w \tilde{M}_L} \right)^{1/2} \quad (\text{A.15})$$

$$\nu_w = 12.7 \text{ für Wasser}$$

$$\nu_L = 20.1 \text{ für Luft}$$

Einheit:  $m^2/s$

## A.2 Wirbelschichtkenngößen

Archimedes-Zahl als Verhältnis der Auftriebs- zur Trägheitskraft

$$Ar = \frac{g\bar{d}_p^3}{\nu_L^2} \frac{\varrho_p - \varrho_L}{\varrho_L} \quad (\text{A.16})$$

mit

$$\bar{d}_p = \frac{6V_{bed}}{A_{bed}} \quad (\text{A.17})$$

definiert.

Empirische Beziehung zur Berechnung der Reynolds-Zahl am Wirbelpunkt

$$Re_{BP} = \frac{Ar}{1400 + 5,22Ar^{0,5}} \quad (\text{A.18})$$

Reynolds-Zahl am Betriebspunkt als Verhältnis der Trägheits- und Zähigkeitskraft

$$Re_{BP} = \frac{w_0 d_p}{\nu_L} \quad (\text{A.19})$$

Relatives Lückenvolumen als Verhältnis des Lückenvolumens zum gesamten Wirbelschichtvolumen

$$\varepsilon = \frac{V_L}{V_{WS}} \quad (\text{A.20})$$

Die Porosität am Lockerungspunkt  $\varepsilon$  nimmt praktisch Werte zwischen 0.4 und 0.7 an.

Empirische Beziehung zur Ermittlung des relativen Lückenvolumens

$$\varepsilon = \left( \frac{18Re_{BP} + 0,36Re_{BP}^2}{Ar} \right)^{0,21} \quad (\text{A.21})$$

Wirbelschichtvolumen als Summe des reinen Lückenvolumens und des Partikelvolumens

$$V_{WS} = V_L + V_{P,ges} \quad (\text{A.22})$$

Partikelvolumen als Quotient der Feststoffmasse und Partikeldichte

$$V_{P,ges} = \frac{m_{WS}}{\rho_P} \quad (\text{A.23})$$

Wirbelschichthöhe als Quotient aus dem Volumen der Schicht und der Anströmfläche

$$H_S = \frac{V_{WS}}{A_{App}} = \frac{4m_P}{(1 - \varepsilon)\rho_P\pi d_{App}^2} \quad (\text{A.24})$$

## A.3 Stoff- und Wärmeübergang in der Wirbelschicht

### A.3.1 Stoff- und Wärmeübergang zwischen Luft und Partikeln

Quelle: Gnielinski (1980)

$$Re = \frac{Re_{BP}}{\varepsilon} \quad (\text{A.25})$$

$$Sc = \frac{\nu_L}{D_{D,L}} \quad (\text{A.26})$$

$$Sh_{lam} = 0.664 Re^{1/2} Sc^{1/3} \quad (\text{A.27})$$

$$Sh_{tur} = \frac{0,037 Re^{0.8} Sc}{1 + 2.443 Re^{-0.1} (Sc^{2/3} - 1)} \quad (\text{A.28})$$

$$Sh_{Einzelkugel} = 2 + \sqrt{Sh_{lam}^2 + Sh_{tur}^2} \quad (\text{A.29})$$

$$Sh_{L,P} = [1 + 1.5(1 - \varepsilon)] Sh_{Einzelkugel} \quad (\text{A.30})$$

Berechnung der scheinbaren Sherwood-Zahl

$$Sh = \frac{Re_{BP} Sc}{\frac{A_{P,ges}}{V_{WS}} H_{WS}} \ln \left( 1 + \frac{Sh_{Einzelkugel,WP} \frac{A_{P,ges}}{V_{WS}} H_{WS}}{Re_{BP} Sc} \right) \quad (\text{A.31})$$

Die Werte für die Nusselt-Zahl werden aus der Analogie zwischen Wärme- und Stoffübergang berechnet:

$$Nu_{L,P} = Sh_{L,P} Le^{-1/3} \quad (\text{A.32})$$

$$Le = \frac{\lambda_L}{c_{L0L} D_{W,L}} \quad (\text{A.33})$$

$$\alpha_{L,P} = \frac{Nu_{L,P} \lambda_L}{d_P} \quad (\text{A.34})$$

### A.3.2 Wärmeübergang zwischen Partikeln und Wand

Quelle: Martin (2013)

$$Nu_{P,W} = \frac{\alpha_{P,W} d_p}{\lambda_L} = (1 - \varepsilon) Z (1 - e^{-N}) \quad (\text{A.35})$$

$$N = \frac{Nu_{P,W,max}}{C_K Z} \quad (\text{A.36})$$

$$Z = \frac{1}{6} \frac{\rho_P c_{P,P}}{\lambda_L} \sqrt{\frac{g d_p^3 (\varepsilon - \varepsilon_{WP})}{5(1 - \varepsilon_{WP})(1 - \varepsilon)}} \quad (\text{A.37})$$

$$C_K = 2.6 \quad (\text{A.38})$$

$$Nu_{P,W,max} = 4 \left[ \left( 1 + \frac{2l}{d_p} \right) \ln \left( 1 + \frac{d_p}{2l} \right) - 1 \right] \quad (\text{A.39})$$

$$l = 2 \left( \frac{2}{\gamma} - 1 \right) \Lambda \quad (\text{A.40})$$

$$\Lambda = \sqrt{\frac{2\pi \tilde{R} T}{\tilde{M}_g}} \frac{\lambda_g}{P(2c_{P,G} - \tilde{R}/\tilde{M}_L)} \quad (\text{A.41})$$

$$\lg \left( \frac{1}{\gamma} - 1 \right) = 0.6 - \left( \frac{1000K}{T_L} + 1 \right) / C_A \quad (\text{A.42})$$

$$C_A = 2.8 \quad (\text{A.43})$$

### A.3.3 Wärmeübergang zwischen Wand und Umgebung

Quelle: Churchill and Chu (1975) (senkrechte Platte)

$$Nu_{W,U} = \frac{\alpha_{W,U} L_{bed}}{\lambda_L} = (0.825 + 0.387 [Ra f_1(Pr)]^{1/8})^2 \quad (\text{A.44})$$

$$Ra = Gr Pr = \frac{\beta g L_{max}^3 (T_W - T_U)}{\nu_L} \quad (\text{A.45})$$

$$\beta_L = \frac{2}{T_U + T_U} \quad (\text{A.46})$$

$$f_1(Pr) = \left[ 1 + \left( \frac{0.492^{9/16}}{Pr} \right) \right]^{-16/9} \quad (\text{A.47})$$

### A.3.4 Wärmeübergang zwischen Luft und Wand

Quelle: Baskakov et al. (1973)

$$Nu_{L,W} = \frac{\alpha_{L,W} d_p}{\lambda_L} = \begin{cases} 0.009 Pr^{1/3} Ar^{1/2} \left( \frac{u}{u_{opt}} \right)^{0.3} & \text{für } w_{WP} < w_0 < w_{opt} \\ 0.009 Pr^{1/3} Ar^{1/2} & \text{für } w_{opt} < w_0 < u_{AP} \end{cases} \quad (\text{A.48})$$

$$Re_{opt} = \frac{w_{opt} d_p}{\nu_L} = 7.5 \left( \frac{g d_p^3}{\nu_L^2} \right)^{0.45} \quad (\text{A.49})$$

## A.4 Ergebnisse und Versuchsdaten

### A.4.1 Zusammenfassung Lagerungsexperimente

Alle während der Lagerung von *L.plantarum* ermittelten Wasseraktivitäten, -gehalte, Inaktivierungskonstanten sind in der Tabelle A.1 zusammengefasst.

**Tabelle A.1:** Zusammenfassung aller ermittelten Wassergehalte, -aktivitäten und Inaktivierungskonstanten nach einer Lagerungszeit von sechs Monaten bei 4 °C und Raumtemperatur

Versuch	$a_w^a$	$X_a$ [%]	T [°C]	$a_w^e$	$X_e$ [%]	$k_l$ [1/Tage]
100520A	0,25	6,4	4	0,27	6,3	-0,021
			25	0,42	6,4	0,220
100520B	-	1,3	4	-	1,4	0,141
			25	-	1,8	0,145
100812B	-	5,2	4	-	-	-0,011
			25	-	-	0,109
100826A	-	4,9	4	-	4,9	-0,016
			25	-	4,8	0,023
100826B	-	0,9	4	-	1,0	-0,036
			25	-	1,1	0,074
100810A	-	5,1	4	-	5,2	-0,008
			25	-	5,0	0,100
100909A	-	5,0	4	-	5,1	-0,024
			25	-	4,9	-0,015
100909B	0,2	5,1	4	0,19	5,1	-0,001
			25	0,41	5,9	0,003
110512A	0,13	4,5	4	0,13	4,5	0,020
			25	0,18	5,3	0,031
101202B	0,14	4,8	4	0,14	4,8	0,018
			25	0,27	6,1	0,038
101021A	0,13	4,6	4	0,13	4,6	-0,005
			25	0,44	5,2	-0,001
110714	0,17	5,9	4	0,20	5,9	0,012
			25	0,38	6,6	0,083

### A.4.2 Bestimmung der Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante während der Trocknung

#### Bestimmung der Inaktivierungskonstante während der Wirbelschichttrocknung bei 40 °C

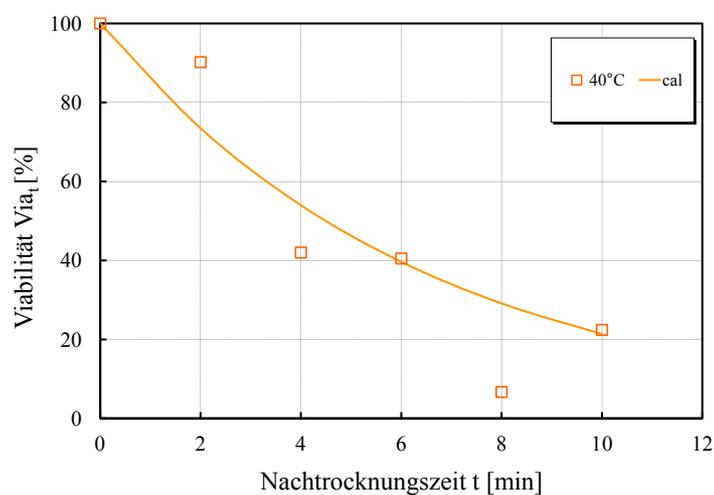
$$T = 40 \text{ °C}$$

$$k_t = 0,154 \text{ min}^{-1}$$

$$Via_0 = 100 \text{ %}$$

**Tabelle A.2:** Experimentell bestimmte und berechnete Viabilitäten während der Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum*

Zeit [min]	Via [%]	$Via_{cal}$ [%]
0	100	100
2	90	73
4	42	54
6	41	40
8	6,7	29
10	22	21



**Abbildung A.1:** Bestimmung der Inaktivierungskonstante  $k_t$  während der Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum* bei  $\vartheta_{ein} = 40 \text{ °C}$ ,  $\dot{M}_{Spr} = 270 \text{ g/h}$ ,  $p_{Spr} = 4 \text{ bar}$ ,  $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85 \text{ kg/h}$  bei einer Eindüsungzeit von 20 Minuten und einer Nachtrocknungszeit von zehn Minuten

**Bestimmung der Inaktivierungskonstante im Trockenschrank**

$$T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$k_t = 0,155 \text{ min}^{-1}$$

$$Via_0 = 100 \%$$

**Tabelle A.3:** Experimentell im Trockenschrank bei 30 °C bestimmte und berechnete Viabilitäten von *L.plantarum*

Zeit [min]	Via [%]	$Via_{cal}$ [%]
0	100	100
3	56	63
6	35	39
10	24	21

$$T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$k_t = 0,261 \text{ min}^{-1}$$

$$Via_0 = 100 \%$$

**Tabelle A.4:** Experimentell im Trockenschrank bei 40 °C bestimmte und berechnete Viabilitäten von *L.plantarum*

Zeit [min]	Via [%]	$Via_{cal}$ [%]
0	100	100
3	46	46
6	38	21
10	21	7

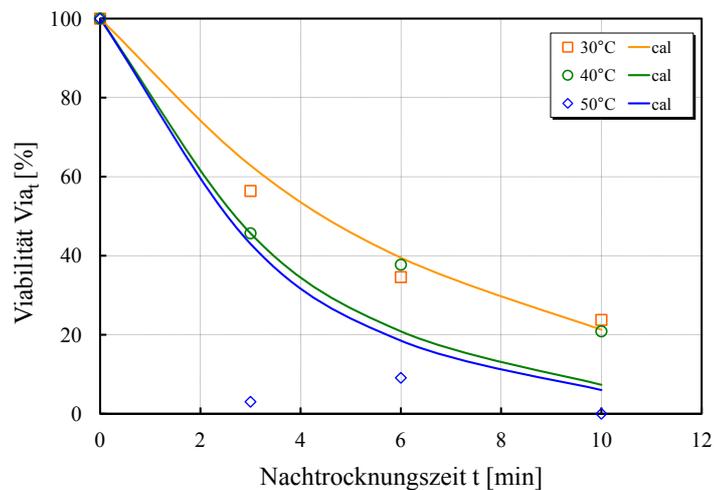
$$T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$k_t = 0,281 \text{ min}^{-1}$$

$$Via_0 = 100 \%$$

**Tabelle A.5:** Experimentell im Trockenschrank bei 50 °C bestimmte und berechnete Viabilitäten von *L.plantarum*

Zeit [min]	Via [%]	$Via_{cal}$ [%]
0	100	100
3	3	43
6	9	19
10	0	6

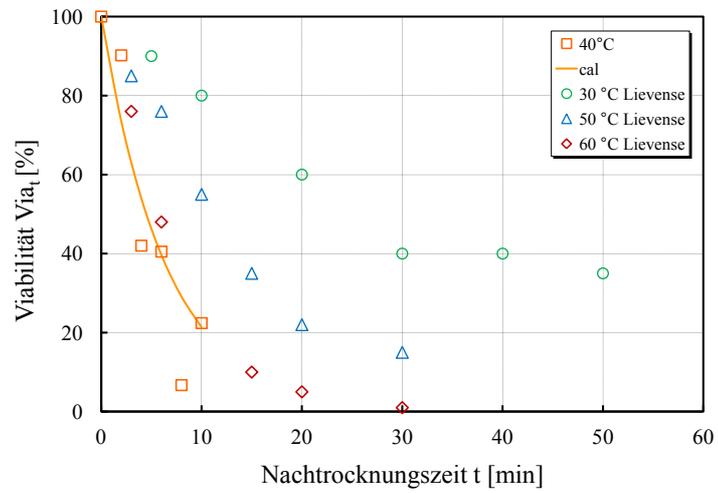


**Abbildung A.2:** Bestimmung der Inaktivierungskonstante  $k_t$  während der zehnmütigen Trocknung von *L.plantarum*-Granulaten im Trockenschrank bei 30, 40 und 50 °C

#### A.4.3 Vergleich Wirbelschichttrocknung mit den Daten von Lievense

**Tabelle A.6:** Aus der Veröffentlichung von Lievense (1991) abgelesene Viabilitäten während der Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum* bei unterschiedlichen Temperaturen

T [°C]	Zeit [min]	A [-]
30	5	90
	10	80
	20	60
	30	40
	40	40
	50	35
50	3	85
	6	76
	10	55
	15	35
	20	22
	30	15
60	3	76
	6	48
	15	10
	20	5
	30	1



**Abbildung A.3:** Vergleich der Daten für die Wirbelschichttrocknung von *L.plantarum* bei  $\vartheta_{ein} = 40\text{ °C}$ ,  $\dot{M}_{Spr} = 270\text{ g/h}$ ,  $p_{Spr} = 4\text{ bar}$ ,  $\dot{M}_{L,Maltodextrin} = 85\text{ kg/h}$  bei einer Eindüsungzeit von 20 Minuten und einer Nachrocknungszeit von zehn Minuten mit den Daten von Lievens (1991)  $\vartheta_{ein} = 90\text{ °C}$ ,  $\dot{M}_L = 450\text{ l/min}$

# Danksagung

Nie ist eine wissenschaftliche Arbeit das Werk einer einzelnen Person. Deshalb ist es nun an der Zeit, mich bei all den Menschen zu bedanken, die mir die Fertigstellung meiner Dissertation überhaupt ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gebührt hierbei an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Evangelos Tsotsas. Trotz der Tatsache, dass er die Betreuung der Thesis erst im laufenden Prozess übernahm, widmete er sich dem Thema mit unendlicher Geduld und Hingabe. Ohne seine stets konstruktive Hilfe und Kritik wäre mir diese Arbeit niemals derart gut gelungen. Für diese besondere Art der Hilfestellung werde ich ihm für immer dankbar sein.

Großer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Christiana Cordes für die hilfreiche Unterstützung im Labor sowie der stets anregenden Diskussionen. Sie ermöglichte mir nicht zuletzt eine unheimlich herzliche Aufnahme an der Hochschule Anhalt in Bernburg, sondern stand mir während des gesamten Projektes mit Rat und Tat zur Seite.

Mein weiterer großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Mirko Peglow und Herrn Wilfried Pergande. Insbesondere durch Herrn Prof. Peglows Engagement bekam ich die Möglichkeit dieses Projekt in Kooperation mit der VTA GmbH zu bearbeiten. Ohne seine Ermutigung, Motivation und Bereitstellung des Themas hätte es diese Dissertation nie gegeben.

All meinen wissenschaftlichen Kollegen am Institut der Otto-von-Guericke Universität und der Hochschule Anhalt in Bernburg danke ich für die Ziel führenden Diskussionen und Hilfe bei der Beantwortung sowie Bearbeitung unterschiedlicher Fragestellungen. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Jun.-Prof. Dr. Andreas Bück für all seine Unterstützung und seinen Rat bedanken. Großer Dank gilt auch meiner ehemaligen Diplomandin Janine Hedderich, die tapfer mit mir in die Schlacht gezogen ist um sich nächtelang der Kultivierung von Mikroorganismen zu stellen. Im gleichen Atemzug möchte ich mich bei meiner ehemaligen Kollegin und Freundin Susann Weinholz bedanken, die das Projekt als Partner über den gesamten Zeitraum mit viel Kraft und Ausdauer begleitete. Die tägliche, gemeinsame Fahrt nach Bernburg und die Zeit im Labor werde ich niemals vergessen.

Nicht minder aufregend waren die vergangenen Jahre für meine Familie und meine Freunde, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Ihnen danke ich für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, mit der sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufmunterten. Besonderer Dank gilt meinem Freund Pierre Klemm, der mir selbst während seiner Auszeit in Südostasien stets mit aller Kraft zur Seite stand und mir Sorgen, Ängste sowie Zweifel nahm. Seiner starken Schulter und Liebe ist die Fertigstellung dieser Arbeit zu verdanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Großmutter Brigitte Wolf bedanken, die mir das Studium erst ermöglichte und mir auch während der Anfertigung der Dissertation stets unterstützend sowie liebevoll zur Seite stand. Nicht zuletzt aus diesem Grund widme ich ihr diese Arbeit.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema:

**”Niedertemperaturgranulierung von Mikroorganismen”**

selbständig und unter Anwendung der von mir angegebenen Literatur sowie der Hinweise meiner Betreuer angefertigt wurde.

Dipl.-Ing. Magdalena Wassermann

29. Juni 2015

# Publikationsliste

## Wissenschaftliche Artikel

Bensch G, Rüger M, Wassermann M, Weinholz S, Reichl U, Cordes C (2014) Flow cytometric viability assessment of lactic acid bacteria starter cultures produced by fluidized bed drying. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98:4897-4909.

## Publizierte Kongressbeiträge

Wassermann M, Weinholz S, Cordes C, Peglow M, Pergande W (2010) Fluidized bed granulation of microorganisms. *17th International Drying Symposium* Magdeburg (Vortrag).

Wassermann M, Ivanova N, Cordes C, Peglow M, Pergande W (2011) Wirbelschichttrocknung von Milchsäurebakterien. *Jahrestreffen der Fachausschusse Agglomerations- und Schuttguttechnik und Trocknungstechnik* Hamburg (Poster).

Wassermann M, Weinholz S, Cordes C (2011) Überleben im Wirbelsturm. *Biotechnica* Hannover (Poster).

Wassermann M, Weinholz S, Cordes C, Peglow M, Pergande W (2011) Granulation of lactic acid bacteria using fluidized bed technology. *Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)* Karlsruhe (Vortrag).

Wassermann M, Weinholz S, Cordes C, Peglow M, Pergande W (2011) Granulation of lactic acid bacteria using fluidized bed technology. *5th International Granulation Workshop Lausanne* Schweiz (Vortrag).

Wassermann M, Weinholz S, Ivanova N, Cordes C, Peglow M, Pergande W (2011) Wirbelschichttrocknung von Milchsäurebakterien. *1st European Congress of Applied Sciences Biotechnology* Berlin (Poster).

Wassermann M, Weinholz S, Hampel N, Cordes C, Peglow M, Pergande W (2012) Wirbelschichttrocknung von Milchsäurebakterien. *Jahrestreffen der Lebensmittelverfahrenstechnik, Rheologie und Trocknungstechnik* Hohenheim (Poster).

## **Studentische Arbeiten**

Pflieder J (2012) Optimierung eines Viabilitätskits für bioaktive Granulate. Bachelorarbeit, Hochschule Anhalt Bernburg.

Hedderich J (2012) Untersuchung des Einflusses von Trehalose und Sorbitol auf die Überlebens- und Lagerfähigkeit von gefrier- und wirbelschichtgetrockneten Milchsäurebakterien. Diplomarbeit, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg.