

RAPORT

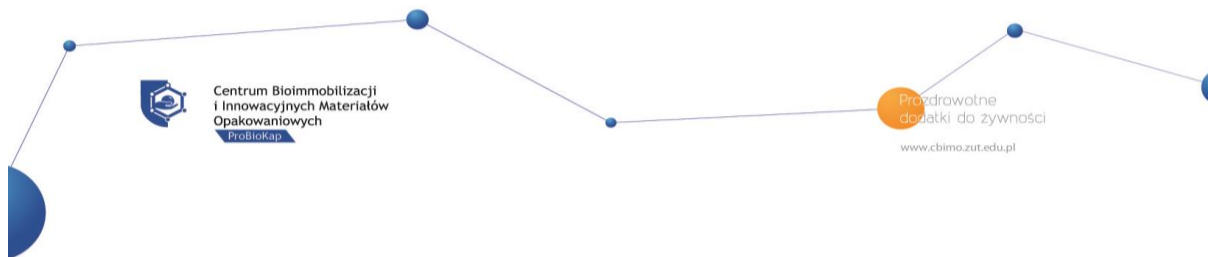
Badania przeżywalności bakterii probiotycznych i ich potencjalny wpływ na NNKT w preparatach suszonych rozpyłowo

Waldemar Dąbrowski, E. Bogusławska-Wąs, Agnieszka Bednarczyk – Drąg, Magdalena Roznowska

w ramach realizacji projektu ProBioKap

„Prozdrowotne dodatki do żywności zawierające immobilizowane nienasycone kwasy tłuszczowe oraz bakterie probiotyczne otrzymywane metodą suszenia rozpyłowego”

nr POIG.01.03.01-32-193/09-06



ZAKRES BADAŃ prowadzonych w ramach projektu ProBioKap

Realizacja zadań etapowych (zadania 4-8) projektu „Prozdrowotne dodatki do żywności zawierające immobilizowane nienasycone kwasy tłuszczowe oraz bakterie probiotyczne otrzymywane metodą suszenia rozpyłowego” (PO IG 2007-2013), pozwoliły na opracowanie procedury suszenia rozpyłowego immobilizowanych NNKT oraz wyselekcjonowanych bakterii probiotycznych, którego końcowy efekt, w ramach zadania 9, poddano atestacji. Wyniki interdyscyplinarnych badań prowadzone przez cztery zespoły badawcze, przyczyniły się do opracowania procedury i wyłonienia produktów proszkowych o najlepszych walorach technologicznych i sensorycznych. Do dalszych analiz wytypowano pięć najlepszych produktów proszkowych, które poddano wnikliwej analizie jakościowej przez zespół projektowy, oraz niezależne laboratorium akredytowane. Obie oceny jakościowe były pozytywne i nie różniły się zasadniczo uzyskanymi wynikami. Otrzymane proszki charakteryzowały się satysfakcjonującym poziomem przeżywalności mikroorganizmów probiotycznych po procesie suszenia i trzy-miesięcznego przechowywania oraz nie stwarzały zagrożenia mikrobiologicznego.

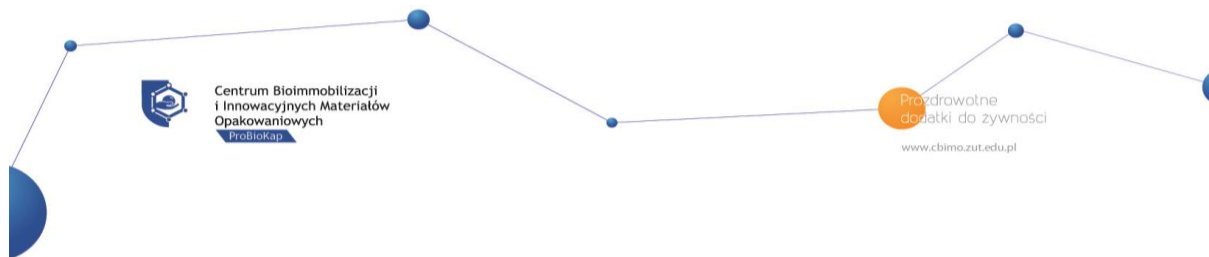
Zakres raportu

W niniejszym raporcie przedstawione zostały wyniki analiz przeżywalności wyselekcjonowanych szczepów probiotycznych obecnych w produktach zawierających naturalne antyoksydanty uzyskanych w procesie suszenia rozpyłowego.

Wprowadzenie

Określenie probiotyków jest zastrzeżone dla preparatów zawierających żywe szczepy bakterii, które wpływają na polepszenie stanu zdrowia ludzi i zwierząt. Zazwyczaj należą one do grupy bakterii tradycyjnie nazywanych bakteriami kwasu mlekowego (lactic acid bacteria – LAB). Ich udział w przetwarzaniu i przechowywaniu żywności nie jest odkryciem ostatnich stuleci. Stosowane od zarania dziejów, bakterie stały się niezbędnym kolonizatorem naszego przewodu pokarmowego, co więcej ich obecność jest konieczna dla prawidłowego funkcjonowania naszego organizmu. Niestety postęp technologiczny, który stał się priorytetem w krajach rozwijających się, spowodował wiele niekorzystnych zmian w tym zaniechanie produkcji żywności naturalnie przetwarzanej na korzyść żywności wysoko przetworzonej. Tym sposobem w codziennej diecie pozbawiliśmy się bakterii fermentacji mlekowej. Można domniemywać, że tak drastyczna zmiana diety stała się jedną z podstawowych przyczyn prowadzących do powstawania zaburzeń żołądkowo-jelitowych czy np. dysfunkcji układu immunologicznego.

Poszerzająca się lista chorób cywilizacyjnych sprowokowała do refleksji i poszukiwania naturalnych źródeł składników bioaktywnych o korzystnych właściwościach. Nastąpił powrót do diety bogatej w błonnik pokarmowy, oligosacharydy, witaminy, antyoksydanty, składniki mineralne i przede wszystkim prebiotyki i probiotyki. Wyłonienie szczepu probiotycznego z ogromnej ilości otaczających nas bakterii wymaga rozlicznych badań. Kryteria probiotyczności bakterii określone



zostały przez FAO/WHO. Obecnie w krajach Unii Europejskiej nad bezpieczeństwem stosowania probiotyków czuwa EFSA (European Food Safety Agency). Obecnie klinicznie udowodnione korzystne działanie ma niespełna 20 szczepów bakterii probiotycznych. Należą do nich przede wszystkim szczepy z grup *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz *Lactococcus*. Wyselekcjonowane szczepy bakterii zasiedlają przewód pokarmowy człowieka (blokują w ten sposób miejsce bakteriom i wirusom chorobotwórczym), ułatwiają przyswajanie żelaza, wapnia i fosforu (chronią przed anemią i osteoporozą), obniżają poziom cholesterolu, wspomagają układ odpornościowy, pomagają przy zaparciach, wzdęciach oraz stanach zapalnych jelit. W wielu jednostkach chorobowych bakterie probiotyczne stosowane są jako środki para-medyczne. Dla celów profilaktycznych zalecane jest ich codzienne stosowanie. Związane z ich spożywaniem korzyści zdrowotne spowodowały wzrost zainteresowania konsumentów tymi produktami żywnościowymi i niekwestionowana obecność na rynku.

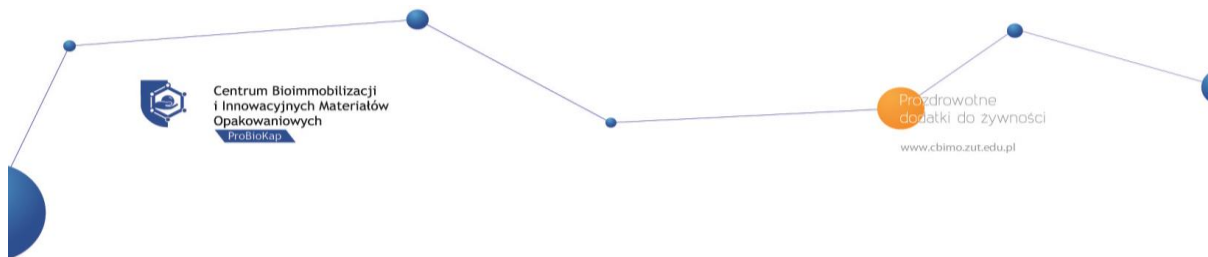
Dostrzegalnym problemem sektora producentów żywności probiotycznej jest ograniczona możliwość długookresowego przechowywania produktów bez wystąpienia powolnego wymierania zawartych w nich bakterii i jednoczesnego obniżania ich wartości. W tym miejscu warto nadmienić, że zalecana przez WHO i FDA dawka terapeutyczna drobnoustrojów probiotycznych w produkcji powinna wynosić 10^7 jtk/g. Kolejnym problemem jest oporność szczepu probiotycznego na czynniki selekcyjne obecne w przewodzie pokarmowym. Kryteria doboru szczepów uwzględniają ten etap w zachowaniu funkcjonalności drobnoustrojów, aczkolwiek dąży się do opracowania takich procesów technologicznych, których efektem będzie również ochrona komórek bakterii probiotycznych przed np. działaniem kwasów żołądkowych.

Opracowanie procedury suszenia rozpyłowego immobilizowanych bakterii probiotycznych wraz z NNKT i otrzymanie produktu w formie suchych proszków o określonych walorach technologicznych stało się odpowiedzią na brak technologii gwarantującej wysoką stabilność czynników aktywnych i realizacją założeń metodycznych projektu.

Materiały i metody

W celu uzyskania immobilizowanych bakterii probiotycznych w postaci proszku jako produktu "gotowego", wyselekcjonowano dwa z 115 testowanych szczepów bakteryjnych (*Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus rhamnosus* GG). Przeznaczone do dalszych badań szczepy spełniały wszystkie kryteria selekcji. Szczegółowe omówienie zakresu badań zawarto w raporcie z zad. 6. Sparametryzowanie warunków hodowli pozwoliło na określenia czasu poboru prób oraz zoptymalizowanie układów do uzyskania maksymalizacji efektu przeżywalności bakterii po procesie suszenia rozpyłowego (raport do zad. 7) z uwzględnieniem czasu przechowywania (raport do zad. 8).

W celu przeprowadzenia ostatecznych analiz jakościowo-ilościowych utworzono pięć receptur emulsji typu o/w do których wprowadzano bakterie probiotyczne. Fazę ciągłą każdej emulsji



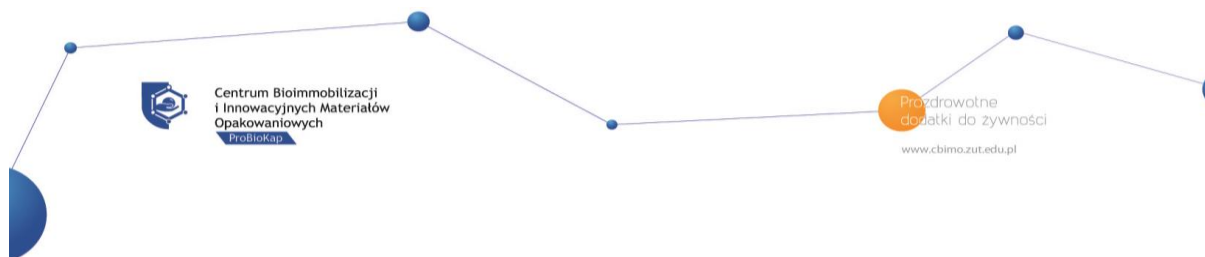
stanowił roztwór skrobi modyfikowanej i maltodekstryny, a fazę rozproszoną tran firmy LYSI (Islandia). Przygotowane emulsje różniły się zastosowanym układem antyoksydantów. Kryteria doboru receptur wynikały z analiz poszczególnych zespołów badawczych. Emulsje badano w układach:

1. *Lactobacillus plantarum* 299v + olejek oregano A / ekstrakt rozmarynowy A [0,5%/1,25%]
2. *Lactobacillus plantarum* 299v + Olejek oregano A / ekstrakt rozmarynowy B [1%/1,25%]
3. *Lactobacillus plantarum* 299v + *Lactobacillus rhamnosus* GG (1:1) + Ekstrakt rozmarynowy B [0,5%]
4. *Lactobacillus rhamnosus* GG + olejek oregano A /olejek goździkowy A/ ekstrakt rozmarynowy A [0,5%/0,5%/0,5%]
5. *Lactobacillus rhamnosus* GG + olejek oregano A /olejek goździkowy A/ ekstrakt rozmarynowy B [0,25%/0,25%/0,5%]

Hodowlę poszczególnych szczepów prowadzono w podłożu MRS Broth do czasu uzyskania fazy log wzrostu. Separacji biomasy dokonywano poprzez odwirowanie hodowli w warunkach 4000 obr/min przez 10 minut. Uzyskany supernatant odrzucano, natomiast osad łączono z emulsją poprzez delikatne mieszanie, do czasu uzyskania jednolitej zawiesiny. Z każdego wariantu badawczego, pobierano próbę do oznaczeń mikrobiologicznych. Otrzymane emulsje poddano suszeniu rozpyłowemu (suszarka rozpyłowa ¼ techniczna - Anhydro, temperatura wejściowa: 180 °C, temp. wyjściowa: 75 - 80°C), w wyniku czego otrzymano suche produkty (immobilizatów zawierających bakterie probiotyczne i tran z wątroby dorsza). Uzyskane proszki zapakowano w folię opakowaniową (Laminat ALUMINIUM Z/M, materiał: PET12/AL8/PE80 S/M) w atmosferze modyfikowanej MAP (25% CO₂/75% N₂). Wszystkie próby przechowywano w temperaturze 4°C przez okres trzech miesięcy, w trakcie których w odstępach miesięcznych przeprowadzono analizy przeżywalności szczepów probiotycznych.

Oznaczanie liczby żywych komórek bakteryjnych wykonano metodami posiewów płytkowych zgodnie z obowiązującą normą PN-ISO 15214:2002. Analizy prowadzono dla próbek emulsji z bakteriami probiotycznymi, pobrane przed procesem suszenia rozpyłowego jak również dla prób po suszeniu rozpyłowym. Wskaźnik przeżywalności bakterii - P_s , po procesie suszenia jak i w czasie przechowywania, wyznaczano jako % liczby żywych komórek bakteryjnych w proszku, oznaczonych jako N , po procesie suszenia lub przechowywania (1, 2, i 3 miesiące) do liczby komórek żywych przed procesem suszenia lub przechowywania, oznaczonych odpowiednio jako N_0 i N_s .

$$P_s = N / N_0 \times 100\% \quad \text{ i } \quad P_s = N / N_s \times 100\%$$



Niezależnie przeprowadzono również analizy, których celem było określenie jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego surowców i preparatów otrzymanych po procesie suszenia rozpyłowego i w czasie ich przechowywania. Zakres badań i podstawy doboru metod zestawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Zestawienie analiz mikrobiologicznych i norm i wytycznych

| Oznaczane wskaźniki | Norma |
|---|---------------------------------------|
| Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych | PN-EN ISO 4833:2004/Ap1:2005 |
| Ogólna liczba drobnoustrojów psychrotrofowych | PN-ISO 17410:2004 |
| Ogólna liczba drożdży i pleśni | PN-ISO 7954:1999; PN-ISO 21527-1:2009 |
| Bakterie z rodziny Enterobacteriaceae | PN-A-04023:2001; PN-ISO 21528-2:2005 |
| Bakterie z grupy coli | PN-ISO 4832:2007 |
| <i>Escherichia coli</i> | PN-ISO 16649-2:2004; PN-ISO 7251:2006 |
| <i>Salmonella</i> spp. | PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | PN-EN ISO 6888-1:2001/A1:2004 |
| <i>Bacillus cereus</i> | PN-EN ISO 7932:2005 |
| Ogólna liczba bakterii beztlenowych | PN-ISO 15213:2005 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | PN-EN 13401:2000; PN-EN ISO 7937:2005 |
| Ogólna liczba drobnoustrojów lipolitycznych | Wg. Burbianka i wsp., 1983 |
| Ogólna liczba drobnoustrojów amylolitycznych | Wg. Burbianka i wsp., 1983 |

Wyniki analiz

1. Zmienność liczebności bakterii probiotycznych w preparatach suszonych rozpyłowo i w czasie przechowywania.

Przeprowadzone badania i wyznaczony wskaźnik przeżywalności szczepów P_s (nie mniejszy niż 10%), wskazują, że proces suszenia rozpyłowego jak również czas przechowywania w warunkach MAP i 4 °C nie wpływały istotnie na redukcję liczebności badanych bakterii. Ustalono, że wyznaczone różnice wartości były nie większe niż jeden log. Związku z powyższym, jednoznacznie można stwierdzić, że opracowane procedury otrzymywania produktu zawierającego bakterie probiotyczne spełniają kryteria technologiczne. Szczegółowe wyniki analiz zawarto w tabeli 2.

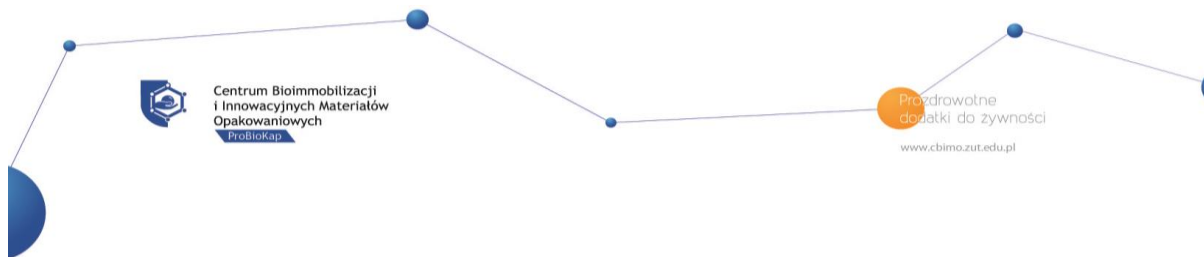


Tabela 2. Liczebność bakterii probiotycznych w badanych próbach przed i po procesie suszenia rozpyłowego oraz w trakcie 3 miesięcznego przechowywania.

| Nr próbki | Liczebność żywych komórek bakterii [jtk/g] | | | | |
|-----------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | W emulsji | Po suszeniu | Po przechowywaniu | | |
| | | | 1 m-c | 2 m-ce | 3 m-ce |
| 1 | $1,89 \times 10^9$ | $2,25 \times 10^8$ | $6,35 \times 10^7$ | $5,70 \times 10^7$ | $2,92 \times 10^7$ |
| 2 | $2,28 \times 10^9$ | $1,15 \times 10^8$ | $9,05 \times 10^7$ | $6,90 \times 10^7$ | $3,75 \times 10^7$ |
| 3 | $3,35 \times 10^9$ | $2,65 \times 10^8$ | $4,17 \times 10^8$ | $8,25 \times 10^7$ | $6,18 \times 10^7$ |
| 4 | $1,07 \times 10^9$ | $1,72 \times 10^8$ | $1,32 \times 10^8$ | $6,18 \times 10^7$ | $1,27 \times 10^7$ |
| 5 | $2,12 \times 10^9$ | $3,20 \times 10^8$ | $1,94 \times 10^8$ | $4,68 \times 10^7$ | $3,35 \times 10^7$ |

2. Ocena jakości mikrobiologicznej surowców i próbek suszonych rozpyłowo

Wyniki przeprowadzonych badań, w kierunku oceny jakości mikrobiologicznej surowców wykorzystywanych do przygotowania preparatów suszonych rozpyłowo, nie wykazały przekroczenia któregokolwiek z kryteriów mikrobiologicznych. Ustalono, że obecna w surowcach mikroflora nie powinna wpływać na jakość uzyskiwanego proszku oraz nie stanowi zagrożenia dla zdrowia potencjalnego konsumenta. Szczegółowe wyniki badań przedstawiono w tabeli 3.

Kontrolą mikrobiologiczną objęto również produkty uzyskane po procesie suszenia rozpyłowego. We wszystkich badanych próbkach, niezależnie od wariantu badawczego, ustalono brak bakterii patogennych. Obecność mikroflory należącej do bakterii psychrofilnych, mezofilnych, grzybów mikroskopowych oraz bakterii wskaźnikowych wskazuje na wysoką jakość mikrobiologiczną uzyskanych produktów, natomiast poziomy oznaczeń bakterii o właściwościach lipolitycznych i amylolitycznych nie stanowią źródła niekontrolowanych procesów zepsucia. Wyniki dla poszczególnych wariantów badawczych (opracowanych receptur) podano w tabelach 4-8.

Tabela 3. Jakość mikrobiologiczna surowców wykorzystywanych do wytwarzania próbek.

| Oznaczone wskaźniki w surowcach | Liczba drobnoustrojów [jtk/g] w badanych surowcach | | | |
|---|--|--------------------|------------------|--------------------|
| | Oleje | Stabilizatory | Antyoksydanty | Emulgatory |
| Liczba drobnoustrojów mezofilnych | $<1 \times 10^2$ | $1,33 \times 10^3$ | $<1 \times 10^2$ | $2,67 \times 10^2$ |
| Liczba mikroorganizmów psychrotrofowych | $<1 \times 10^2$ | $4,0 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $6,7 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba drożdży i pleśni | $<1 \times 10^2$ | $2,0 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Bakterie z rodziny Enterobacteriaceae | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Bakterie z grupy coli | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Escherichia coli</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Salmonella</i> spp. | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | $4,7 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| <i>Bacillus cereus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba bakterii beztlenowych | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Clostridium perfringens</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Liczba drobnoustrojów lipolitycznych | $<1 \times 10^2$ | $2,0 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Liczba drobnoustrojów amylolitycznych | $3,0 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |

Tabela 4. Wyniki oceny jakości mikrobiologicznej próbki 1 (Lp 299v) po suszeniu i przechowywaniu.

| Oznaczone wskaźniki w surowcach | Liczba drobnoustrojów [jtk/g] | | | |
|---|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Po suszeniu | Po przechowywaniu | | |
| | | 1 mc | 2 m-ce | 3 m-ce |
| Liczba drobnoustrojów mezofilnych | $2,21 \times 10^4$ | $7,33 \times 10^3$ | $5,45 \times 10^3$ | $2,67 \times 10^3$ |
| Liczba mikroorganizmów psychrotrofowych | $3,23 \times 10^2$ | $4,0 \times 10^2$ | $4,11 \times 10^2$ | $1,7 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba drożdży i pleśni | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Bakterie z rodziny Enterobacteriaceae | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Bakterie z grupy coli | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Escherichia coli</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Salmonella</i> spp. | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| <i>Bacillus cereus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba bakterii beztlenowych | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Clostridium perfringens</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Liczba drobnoustrojów lipolitycznych | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Liczba drobnoustrojów amylolitycznych | $3,0 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |

Tabela 5. Wyniki oceny jakości mikrobiologicznej próbki 2 (Lp 299v) po suszeniu i przechowywaniu.

| Oznaczone wskaźniki w surowcach | Liczba drobnoustrojów [jtk/g] | | | |
|---|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Po suszeniu | Po przechowywaniu | | |
| | | 1 mc | 2 m-ce | 3 m-ce |
| Liczba drobnoustrojów mezofilnych | $9,11 \times 10^3$ | $7,16 \times 10^3$ | $4,27 \times 10^3$ | $6,7 \times 10^3$ |
| Liczba mikroorganizmów psychrotrofowych | $4,11 \times 10^2$ | $3,7 \times 10^2$ | $2,27 \times 10^2$ | $3,62 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba drożdży i pleśni | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Bakterie z rodziny Enterobacteriaceae | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Bakterie z grupy coli | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Escherichia coli</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Salmonella</i> spp. | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| <i>Bacillus cereus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba bakterii beztlenowych | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Clostridium perfringens</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Liczba drobnoustrojów lipolitycznych | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Liczba drobnoustrojów amylolitycznych | $3,0 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |

Tabela 6. Wyniki oceny jakości mikrobiologicznej próbki 3 (Lp 299v+LGG) po suszeniu i przechowywaniu.

| Oznaczone wskaźniki w surowcach | Liczba drobnoustrojów [jtk/g] | | | |
|---|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Po suszeniu | Po przechowywaniu | | |
| | | 1 mc | 2 m-ce | 3 m-ce |
| Liczba drobnoustrojów mezofilnych | $3,13 \times 10^5$ | $6,68 \times 10^4$ | $4,93 \times 10^4$ | $3,16 \times 10^4$ |
| Liczba mikroorganizmów psychrotrofowych | $1,43 \times 10^3$ | $9,89 \times 10^2$ | $7,16 \times 10^2$ | $5,71 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba drożdży i pleśni | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Bakterie z rodziny Enterobacteriaceae | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Bakterie z grupy coli | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Escherichia coli</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Salmonella</i> spp. | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| <i>Bacillus cereus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba bakterii beztlenowych | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Clostridium perfringens</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Liczba drobnoustrojów lipolitycznych | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Liczba drobnoustrojów amylolytycznych | $3,0 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |

Tabela 7. Wyniki oceny jakości mikrobiologicznej próbki 4 (LGG) po suszeniu i przechowywaniu.

| Oznaczone wskaźniki w surowcach | Liczba drobnoustrojów [jtk/g] | | | |
|---|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Po suszeniu | Po przechowywaniu | | |
| | | 1 mc | 2 m-ce | 3 m-ce |
| Liczba drobnoustrojów mezofilnych | $2,13 \times 10^4$ | $2,28 \times 10^4$ | $6,7 \times 10^3$ | $4,11 \times 10^3$ |
| Liczba mikroorganizmów psychrotrofowych | $2,18 \times 10^2$ | $2,33 \times 10^2$ | $1,19 \times 10^2$ | $2,4 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba drożdży i pleśni | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Bakterie z rodziny Enterobacteriaceae | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Bakterie z grupy coli | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Escherichia coli</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Salmonella</i> spp. | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| <i>Bacillus cereus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba bakterii beztlenowych | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Clostridium perfringens</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Liczba drobnoustrojów lipolitycznych | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Liczba drobnoustrojów amylolicylnych | $3,0 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |

Tabela 8. Wyniki oceny jakości mikrobiologicznej próbki 5 (LGG) po suszeniu i przechowywaniu.

| Oznaczone wskaźniki w surowcach | Liczba drobnoustrojów [jtk/g] | | | |
|---|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Po suszeniu | Po przechowywaniu | | |
| | | 1 mc | 2 m-ce | 3 m-ce |
| Liczba drobnoustrojów mezofilnych | $4,13 \times 10^4$ | $3,27 \times 10^4$ | $1,23 \times 10^4$ | $2,29 \times 10^4$ |
| Liczba mikroorganizmów psychrotrofowych | $8,17 \times 10^2$ | $7,16 \times 10^2$ | $4,68 \times 10^2$ | $5,11 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba drożdży i pleśni | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Bakterie z rodziny Enterobacteriaceae | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Bakterie z grupy coli | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Escherichia coli</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Salmonella</i> spp. | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g | brak w 25g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| <i>Bacillus cereus</i> | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Ogólna liczba bakterii beztlenowych | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| <i>Clostridium perfringens</i> | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g | brak w 1g |
| Liczba drobnoustrojów lipolitycznych | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| Liczba drobnoustrojów amylolitycznych | $3,0 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |

Podsumowanie

Uzyskane w wyniku opracowania receptur produkty w postaci suszonych rozpyłowo proszków charakteryzowała wysoka jakość mikrobiologiczna. Nie stwierdzono obecności bakterii chorobotwórczych ani mikroflory odpowiadającej za procesy zepsucia (jeliczenie, hydroliza) składników preparatów. Ponadto, stwierdza się, że w trakcie procesu otrzymywania emulsji oraz suszenia rozpyłowego nie doszło do wtórnego zanieczyszczenia. Zarówno surowce jak i produkty wynikowe charakteryzowały się bardzo wysoką jakością mikrobiologiczną, również po czasie trzymiesięcznego przechowywania.