

POPRAWA STABILNOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ INNOWACYJNEGO SUPLEMENTU DIETY OPARTEGO NA BIOMASIE DROŻDŻY *YARROWIA LIPOLYTICA*

**Wojciech Białas, Adrian Czerniak, Anna Dobrowolska, Joanna Wojciechowska,
Włodzimierz Grajek**

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

Streszczenie

Biomasa drożdży *Yarrowia lipolytica* stanowi bogate źródło łatwo strawnych białek oraz licznych witamin, co powoduje, że może być z powodzeniem wykorzystywana jako wartościowy dodatek do pasz, zarówno w postaci ciekłej, jak i suchej. Niestety produkty ciekłe bardzo szybko ulegają procesom psucia mikrobiologicznego. Celem badań była ocena możliwości zastosowania wybranych substancji chemicznych do poprawy jakości mikrobiologicznej wysokobiałkowych produktów ciekłych produkowanych z biomasy *Yarrowia lipolytica*. Badania wykonano, korzystając z metody statystycznej opartej na planach dla mieszanin. Jakość mikrobiologiczną oceniano na podstawie wyników posiewów w kierunku ustalenia ogólnej liczby bakterii mezofilnych, drożdży, pleśni, a także bakterii z grupy coli oraz *Salmonella* sp. Badania przechowalnicze prowadzono w temperaturze 4°C oraz 25°C. W charakterze substancji konserwujących zastosowano benzoosan sodu oraz sorbinian potasu.

W próbie kontrolnej, bez dodatku substancji konserwujących nie stwierdzono obecności drożdży, pleśni oraz bakterii z grupy coli oraz *Salmonella* sp. Wysoka była natomiast średnia liczba mezofilnych drobnoustrojów tlenowych, która wynosiła $2,01 \pm 0,04 \log_{10}$ jtk/ml. Ich liczba rosła w trakcie przechowywania i po 10 dniach wynosiła odpowiednio $2,17 \pm 0,15$ i $2,34 \pm 0,25 \log_{10}$ jtk/ml dla prób przechowywanych w temperaturze 4°C i 25°C. Zastosowanie konserwantów pozwoliło na obniżenie liczebności bakterii w trakcie przechowywania, przy czym największy wpływ na redukcję liczby komórek bakterii miał benzoosan sodu. Optymalne stężenie benzoosan sodu w gotowym produkcie wynosiło 2500 mg/l. Zastosowanie tego środka konserwującego przyczyniło się do znaczącej poprawy

jakości i bezpieczeństwa produktu, co zostało potwierdzone podczas badań walidacyjnych trwających 30 dni.

Słowa kluczowe: stabilność mikrobiologiczna, benzoosan sodu, *Yarrowia lipolytica*, kawitacja

IMPROVEMENT OF MICROBIOLOGICAL STABILITY OF INNOVATIVE DIETARY SUPPLEMENT BASED ON THE BIOMASS OF *YARROWIA LIPOLYTICA*

Summary

Yarrowia lipolytica biomass constitutes a rich source of easily digestible proteins and numerous vitamins, which makes it a valuable additive for both liquid and dry feeds. Unfortunately, the liquid products acquired through hydrodynamic cavitation are susceptible to the growth of undesirable microflora. They are, therefore, characterized by a relatively short shelf life. The aim of the presented research was to assess the possibility of using selected chemical substances to stabilize the high-protein liquid products acquired from *Yarrowia lipolytica* biomass in terms of improving their microbiological quality. The research was designed with the use of a statistical method based on mixture designs. Microbiological stability was assessed using the results of culture tests aimed at calculating the total number of mesophilic bacteria, yeasts, molds, and bacteria from the coli and *Salmonella sp.* groups. Storage tests were performed at temperatures of 4 and 25°C. Sodium benzoate and potassium sorbate were used as preservatives.

No yeasts, molds, or bacteria from the coli and *Salmonella sp.* groups were found in the control sample, which did not contain any preservatives. However, the mean number of aerobic mesophilic microorganisms was relatively high and amounted to $2,01 \pm 0,04 \log_{10}$ Cfu/ml. Their number was growing during storage and after 10 days it amounted to $2,17 \pm 0,15$ and $2,34 \pm 0,25 \log_{10}$ Cfu/ml, for storage tests at temperatures of 4°C and 25°C, respectively. The use of preservatives resulted in a decrease in the numbers of bacteria during storage, with the highest significance in the reduction of the number of bacterial cells exhibited by sodium benzoate. The optimum concentration of sodium benzoate in the finished product was 2500 mg/l, regardless of the storage temperature. The use of this preservative contributes to a significant improvement in the quality and safety of the product, which was also confirmed by 30-day validation studies.

Key words: microbial stability, sodium benzoate, *Yarrowia lipolytica*, cavitation

WPROWADZENIE

W ostatnim czasie mamy do czynienia z dynamicznym wzrostem produkcji zwierzęcej, co jest w dużej mierze skorelowane ze wzrostem zamożności społeczeństw w krajach rozwijających się. Narastający popyt na produkty mięsne oraz mleczne powoduje konieczność zwielokrotnienia produkcji pasz zawierających dodatek wysokobiałkowych komponentów. Zapotrzebowanie na łatwo przyswajalne białko jest bardzo duże, ponieważ wyprodukowanie 1 kg mięsa wymaga od 3 do 10 kg ziarna [Tilman i in. 2002]. Aktualnie produkcja zwierzęca opiera się głównie na wykorzystaniu pasz zawierających dodatek śruty sojowej. Coraz większym zainteresowaniem ze strony przemysłu paszowego cieszą się także drożdże *Y. lipolytica* produkowane metodami biotechnologicznymi. Szczep ten posiada zdolność intensywnego wzrostu na tłuszczach roślinnych, degumingu oraz frakcji glicerynowej powstającej podczas produkcji biodiesla. Biomasa komórkowa stanowi bogate źródło łatwo strawnych białek (41–45%) oraz licznych witamin. W 2009 roku polska firma Skotan S.A. we współpracy z naukowcami z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu opracowała unikalną w skali światowej technologię przemysłowej produkcji biomasy drożdży paszowych *Y. lipolytica* [Rymowicz 2009]. W 2010 roku Europejska Federacja Producentów Pasz (FEFAC) zarejestrowała produkt występujący pod postacią proszku uzyskiwanego na drodze suszenia rozpyłowego [Rywińska i in. 2013]. Niestety w ciągu ostatnich kilku lat cena glicerolu technicznego, stanowiącego główny surowiec w procesie produkcji wspomnianych drożdży, znacznie wzrosła. W 2010 roku wynosiła około 90 euro/tonę, podczas gdy aktualnie wynosi ponad 280 euro/tonę. W rezultacie zdecydowano się na daleko idące modyfikacje technologii opracowanej w 2009 roku. Zrezygnowano z energochłonnego procesu suszenia i produkt w postaci proszku zastąpiono preparatem w postaci płynnej. W celu inaktywacji komórek drożdży zastosowano innowacyjną metodę opartą na procesie kawitacji hydrodynamicznej, która umożliwia skuteczną dezintegrację komórek. Niestety produkt uzyskiwany po procesie kawitacji hydrodynamicznej, ze względu na wysoką zawartość łatwo przyswajalnych składników odżywczych, charakteryzuje się wysoką podatnością na zakażenia mikrobiologiczne. Zachowuje stabilność w warunkach chłodniczych jedynie przez okres kilku dni, co z praktycznego punktu widzenia znacznie utrudnia jego transport oraz zmusza końcowych odbiorców do kosztownych modernizacji pomieszczeń magazynowych znajdujących się w otoczeniu chlewni czy obór. Dlatego celem prezentowanej pracy było wyznaczenie optymalnej dawki substancji konserwujących, pozwalających na przechowywanie płynnego preparatu przez minimum 10 dni w temperaturze 25°C. W charakterze substancji konserwujących wykorzystano benzoesan sodu oraz sorbinian

potasu, związki chemiczne powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym do stabilizacji różnego rodzaju produktów [Lennerz i in. 2015]. Ich cechą charakterystyczną jest bardzo szerokie spektrum działania. Poza tym substancje te nie wpływają na barwę oraz smak gotowego produktu [Alnoman i in. 2015]. Badania zaplanowano, korzystając z metody statystycznej opartej na planach dla mieszanin. Stabilność mikrobiologiczną oceniano na podstawie wyników posiewów na podłożu selektywne.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Mikroorganizm oraz skład pożywki hodowlanej

W badaniach stosowano szczep *Y. lipolytica* YL-A101 pochodzący z kolekcji Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W procesie produkcji biomasy zastosowano pożywkę o składzie opisanym w patencie US 2011/0111090 A1 [Baszczok i Rymowicz 2011]. Źródłem węgla był glicerol odpadowy powstający podczas produkcji biodiesla.

Proces produkcji ciekłego suplementu diety

Pierwszym etapem produkcji suplementu w postaci płynnej była hodowla szczepu *Y. lipolytica* YL-A101 w bioreaktorze o pojemności całkowitej 15 m³. Hodowlę prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 30±1°C, przy pH równym 3,5. Hodowlę natleniano z szybkością 1,5 vvm, co pozwoliło na utrzymanie stałego poziomu nasycenia pożywki tlenem (20%). W podanych warunkach hodowli produktywność biomasy wynosiła około 2,5 g/l×h [Baszczok i Rymowicz 2011]. Po procesie hodowli zawiesinę komórek przepompowywano do zbiornika magazynowego. W kolejnym etapie biomasę poddawano procesowi dezintegracji, mającemu na celu inaktywację komórek oraz fragmentację ich pozostałości. Proces ten prowadzono za pomocą hydrodynamicznego kawitatora przepływowego o działaniu ciągłym (Unister Plus, Polska). Kawitator był wyposażony w wysokociśnieniową pompę tłokową oraz głowicę kawitacyjną. Ciśnienie robocze podczas kawitacji wynosiło 8,2 MPa, natomiast liczba pasaży zawiesiny przez głowicę kawitacyjną była równa 18. Zawiesinę komórek przed procesem kawitacji podgrzewano na wymienniku ciepła typu rura w rurze do temperatury 72±2°C. Po zakończeniu procesu kawitacji zawiesinę chłodzono do temperatury 10°C i przepompowywano do zbiornika magazynowego zasilającego linię do rozlewu produktu w worki polietylenowe o pojemności 2 l, które były wyposażone w szczelnie zamknięty korek oraz septę wykonaną z gumy silikonowej. Zbiorniki magazynowe oraz linia do rozlewu nie były aseptyczne. Tak przygotowany produkt wykorzystywano do dalszych badań, mających na celu optymalizację składu mieszaniny konserwującej.

Planowanie oraz wykonanie eksperymentów

Cechą charakterystyczną planów eksperymentu dla mieszanin jest występowanie warunku sumowalności czynników oraz liniowych ograniczeń nałożonych na wartości tych czynników. W praktyce oznacza to, że w danym wariacie eksperymentu poszczególne poziomy czynników stanowią ułamki, których suma zawsze równa się 1 [Cox i Reid 2000]. W celu określenia wpływu poszczególnych substancji konserwujących na stabilność mikrobiologiczną produktu zastosowano D- optymalny plan dwuczynnikowy, który zakładał wykonanie 15 eksperymentów (tabela 1). Minimalne oraz maksymalne poziomy czynników zastosowane w badaniach kształtowały się następująco: benzoosan sodu (0–2500 mg/l) oraz sorbinianu potasu (0–2500 mg/l).

Tabela 1. Stężenia składników w mieszaninach konserwujących przygotowanych zgodnie z planem dla mieszanin wraz wynikami eksperymentów w postaci \log_{10} jtk/ml z ogólnej liczby bakterii mezofilnych
Component concentrations in the preservative mixtures prepared in accordance with mixture designs and experiment results expressed as \log_{10} Cfu/ml from the total number of mesophilic bacteria

L.p.	Skala rzeczywista [mg/l]		Skala standaryzowana [-]		Liczba komórek \log_{10} jtk/ml	
	Benzoosan	Sorbinian	Benzoosan	Sorbinian	temp.= 4°C	temp.= 25°C
1	2500	0	1	0	1,362	1,919
2	1666,7	833,33	0,667	0,333	1,778	1,954
3	0	2500	0	1	2,041	2,130
4	1250	1250	0,5	0,5	1,845	2,000
5	625	1875	0,25	0,75	1,987	2,021
6	2500	0	1	0	1,398	1,903
7	833,3	1666,67	0,333	0,667	1,903	1,991
8	0	2500	0	1	2,079	2,146
9	1250	1250	0,5	0,5	1,778	1,954
10	2500	0	1	0	1,447	1,934
11	1250	1250	0,5	0,5	1,740	1,973
12	0	2500	0	1	2,061	2,079
13	1875	625	0,75	0,25	1,740	1,954
14	2500	0	1	0	1,477	1,968
15	0	2500	0	1	2,079	2,114

Konserwanty wchodzące w skład danej mieszaniny (tabela 1) rozpuszczano w wodzie destylowanej, a następnie filtrowano przez filtr o średnicy porów 0,22 μm (Millipore, USA).

Konserwanty wprowadzono do worków zawierających ciekły produkt w warunkach aseptycznych. Worki przemywano z zewnątrz 75% (v/v) roztworem etanolu, a następnie umieszczano je w komorze laminarnej (Holten, Denmark). Konserwanty wprowadzono przez septę za pomocą jałowej strzykawki wyposażonej w jałową igłę. Po wymieszaniu worki przenoszono do komór klimatycznych, w których w zależności od wariantu doświadczenia panowała temperatura 4°C lub 25°C (Philips, Holandia). Worki przechowywano bez dostępu światła przez 10 dni. Po upływie tego czasu przeprowadzono analizy mikrobiologiczne. Każdy z eksperymentów wykonywano w trzech powtórzeniach. Próbkę kontrolną stanowiły worki z produktem bez dodatku konserwantów.

Analizy mikrobiologiczne

Próbki do badań mikrobiologicznych zostały przygotowane zgodnie z zaleceniami polskich norm dotyczących badań mikrobiologicznych żywności oraz pasz [PN-EN ISO 6887-1:2000; PN-EN ISO 7218:2008]. Całkowitą liczbę mezofilnych bakterii tlenowych oznaczono według normy PN-EN ISO 4833-2:2013-12. Całkowitą liczbę grzybów oraz pleśni oznaczono zgodnie z normą PN-ISO 21527-1:2009. Bakterie *Escherichia coli* oznaczono według normy PN-ISO 4831:1998. Oznaczenie obecności pałeczek z rodzaju *Salmonella spp.* wykonano według normy PN-EN ISO 6579:2003. Wyniki wyrażono jako \log_{10} jtk/ml.

Analiza danych oraz optymalizacja składu mieszaniny konserwującej

Dane uzyskane podczas badań mikrobiologicznych wykorzystano do wyznaczenia modelu regresji w postaci równania Scheffégo:

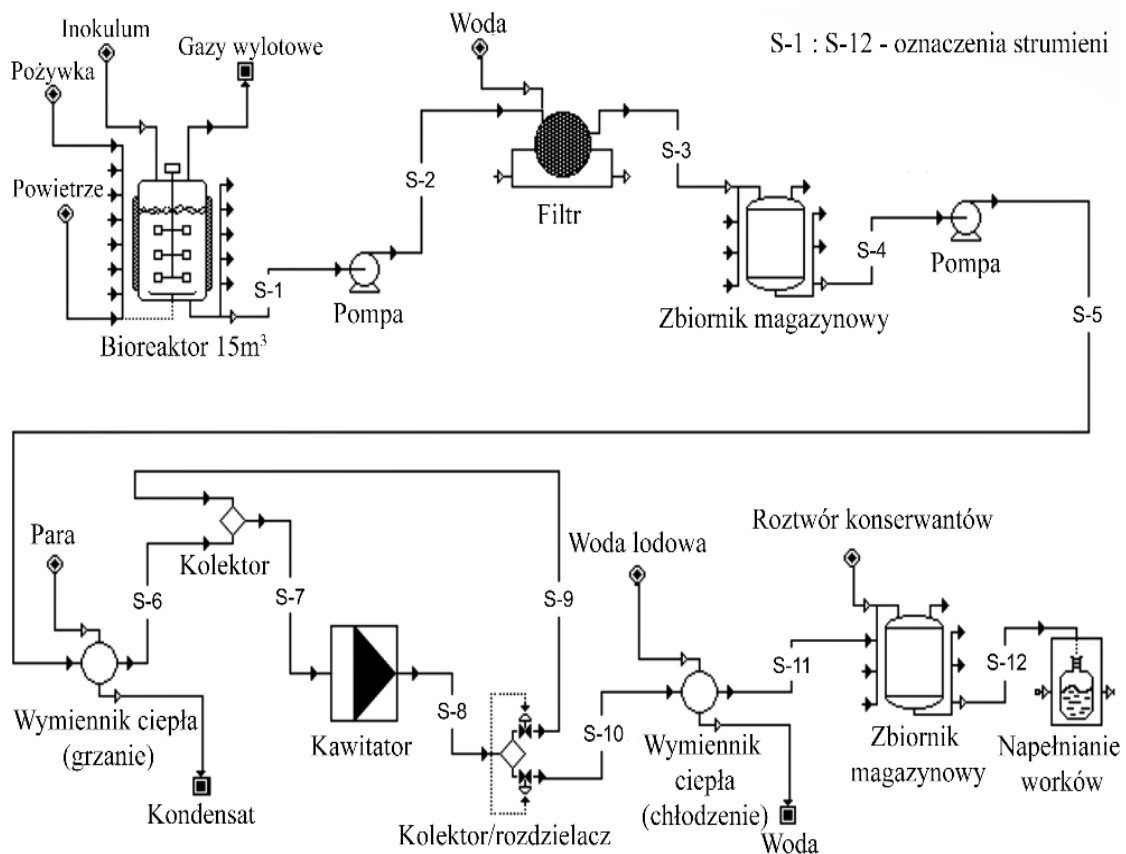
$$Y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i < j}^{q-1} \sum_j^q \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

gdzie: Y to zmienna zależna natomiast β to współczynniki modelu regresji. Model składa się z q efektów liniowych ($\beta_i x_i$, $i = 1, 2, \dots, q$) i $Q = q(q - 1)/2$ efektów kwadratowych o charakterze interakcji ($\beta_{ij} x_i x_j$, $1 \leq i < j \leq q$). Wnioskowanie statystyczne wykonano przy $\alpha = 0,05$. Jakość modelu oceniano na podstawie poprawionego współczynnika determinacji (Popr.- R^2) oraz wartości prawdopodobieństwa p . Na podstawie modelu regresji wyznaczono optymalny skład mieszaniny konserwującej, który pozwala skutecznie ograniczyć rozwój obcej mikroflory w produkcie podczas jego przechowywania. W celu weryfikacji poprawności przeprowadzonych obliczeń wykonano badania walidacyjne, które trwały 30 dni. Uzyskane dane porównano z wartościami przewidywanymi za pomocą modeli regresji. W badaniach wykorzystano oprogramowanie Design-Expert 9 (Stat-Ease, USA) oraz Origin 2015 Pro (OriginLab, USA).

WYNIKI

Ocena jakości mikrobiologicznej próby kontrolnej

Technologia produkcji ciekłego suplementu diety na bazie drożdży *Y. lipolytica* składa się z kilku etapów (rysunek 1). Analiza instalacji produkcyjnej wskazała istnienie dwóch krytycznych punktów kontrolnych, które mogły być potencjalnym źródłem wtórnych zanieczyszczeń mikrobiologicznych na linii produkcyjnej. Pierwszym z nich była instalacja do hydrodynamicznej kawitacji, której zadaniem była dezintegracja komórek drożdżowych. Ewentualna praca tego urządzenia przy parametrach innych niż optymalne (niższej temperaturze, ciśnieniu kawitacji oraz mniejszej liczbie pasaży) mogła być przyczyną obniżonej skuteczności procesu. W rezultacie żywe komórki mikroorganizmów obecne w produkcie były zdolne do dalszego wzrostu w trakcie jego przechowywania. Kolejnymi punktami krytycznymi były zbiorniki magazynowe oraz linia do rozlewu, która nie była aseptyczna. Mając na uwadze oba punkty kontrolne, ocenę jakości mikrobiologicznej produktu wykonano bezpośrednio po procesie kawitacji hydrodynamicznej oraz po rozlewie do worków polietylenowych.



Rysunek 1. Linia technologiczna do produkcji ciekłego suplementu diety

Processing line for the production of the diet supplement

W pierwszej próbie pobranej bezpośrednio za głowicą kawitatora nie stwierdzono obecności żadnej z badanych grup mikroorganizmów. Zarówno komórki drożdży, jak i ewentualna obca mikroflora zostały zatem inaktywowane podczas kawitacji. W drugiej próbie kontrolnej, stanowiącej gotowy produkt po procesie rozlewu do worków polietylenowych, nie stwierdzono obecności drożdży, pleśni oraz bakterii z grupy coli i *Salmonella sp.* Zastrzeżenia budziła jedynie dość wysoka liczba mezofilnych drobnoustrojów tlenowych, która wynosiła $2,01 \pm 0,04 \log_{10}$ jtk/ml. W trakcie przechowywania liczebność tych mikroorganizmów zmieniała się, przy czym dynamika tych zmian była zależna od temperatury przechowywania. Zgodnie z oczekiwaniami, najniższe poziomy zakażenia notowano w próbach przechowywanych w 4°C – po 10 i 30 dniach przechowywania liczba komórek bakteryjnych wynosiła odpowiednio $2,17 \pm 0,15$ oraz $3,52 \pm 0,28 \log_{10}$ jtk/ml. Bardziej znaczące różnice zanotowano w przypadku prób przechowywanych w 25°C – po 10 i 30 dniach przechowywania liczba komórek bakteryjnych wynosiła odpowiednio $2,34 \pm 0,25$ i $6,21 \pm 0,15 \log_{10}$ jtk/ml. Zgodnie z obowiązującymi dotychczas normami krajowymi dotyczącymi jakości mikrobiologicznej żywności oraz pasz maksymalna ogólna liczba mezofilnych bakterii tlenowych nie powinna przekroczyć 3×10^6 jtk/g ($6,47 \log_{10}$ jtk/g) [PN-EN ISO 7218:2008]. Zatem produkt przechowywany przez 30 dni w warunkach chłodniczych spełniał te kryteria jakościowe. Znacznie gorzej kształtowały się wyniki uzyskane w próbach przechowywanych w temperaturze pokojowej. Po upływie 30 dni ilość komórek była nieznacznie niższa od górnej granicy określonej przez wspomnianą normę krajową. Należy zauważyć, że aktualnie w Unii Europejskiej nie ma jednoznacznie określonych kryteriów dotyczących maksymalnego dopuszczalnego limitu zanieczyszczeń mikrobiologicznych w paszach [Kwiatek i in. 2008]. Stosowane obecnie kryteria nie dopuszczają jedynie obecności pałeczek *Salmonella* w 25 g paszy oraz *C. perfringens* w 1 g mączki zwierzęcej. Ograniczono także liczbę bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w mączkach zwierzęcych (przyjmuje się, że w 2 spośród 5 badanych próbek poziom zanieczyszczenia tymi bakteriami nie może przekroczyć 300 jtk/g). Teoretycznie zatem produkt można by wprowadzić na rynek komercyjny w jego pierwotnej formie (bez dodatku substancji konserwujących), przy założeniu, że przestrzegane będą zasady tzw. ciągłości łańcucha chłodniczego. W przeciwnym razie intensywny rozwój obcej mikroflory będzie przyczyną sukcesywnego obniżania się zawartości składników odżywczych uwolnionych z komórek drożdży podczas ich dezintegracji. Spełnienie tego warunku jest zwykle dość trudne i wiąże się z dodatkowymi kosztami inwestycyjnymi, zarówno po stronie dystrybutora, jak i końcowego odbiorcy. W celu wyeliminowania konieczności stosowania obniżonej

temperatury podczas transportu oraz składowania gotowego produktu zdecydowano się na zastosowanie substancji konserwujących.

Wpływ substancji konserwujących na stabilność produktu

Jak wskazują dane zawarte w tabeli 1, liczba bakterii wyrażona za pomocą \log_{10} jtk/ml różniła się istotnie w zależności od składu mieszaniny konserwującej. W przypadku prób przechowywanych w warunkach chłodniczych, liczba komórek wynosiła – w zależności od wariantu doświadczenia – od 1,36 do 2,08 \log_{10} jtk/ml. Przechowywanie w temperaturze 25°C powodowało, że poziom zakażenia był nieznacznie wyższy, liczba komórek zawierała się w zakresie od 1,9 do 2,15 \log_{10} jtk/ml. Zastosowane dodatki pozwoliły na redukcję liczby komórek w odniesieniu do próby kontrolnej, jednakże uzyskane rezultaty nie były tak spektakularne, jak tego oczekiwano. Aktywność antymikrobiologiczna słabych kwasów organicznych (kwasu benzoowego czy sorbowego) oraz ich soli (benzoianu sodu oraz sorbinianu potasu) zależy w bardzo dużym stopniu od pH środowiska. Generalnie, im niższe pH, tym większa skuteczność tych substancji [Alnoman 2015]. Wynika to w głównej mierze z tego, że w roztworach o pH silnie kwaśnym większość reszt pochodzących od wspomnianych kwasów występuje w formie niezdysocjowanej. Niskie pH oraz charakter lipofilowy tych cząsteczek sprzyja ich swobodnemu przenikaniu przez barierę, jaką stanowi membrana komórkowa, zawierającą hydrofobową warstwę lipidową. Po zakończeniu procesu kawitacji pH produktu wynosiło 5,06. W tych warunkach stężenie niezdysocjowanej formy kwasu benzoowego oraz sorbowego, obliczone na podstawie równania Hendersona-Hasselbalcha, wynosiło odpowiednio 12% oraz 29%. Ilość cząsteczek konserwantów wnikająca do wnętrza komórek była prawdopodobnie niewielka, stąd niższa skuteczność od pierwotnie zakładanej.

Wyniki analizy statystycznej wskazały, że oba składniki mieszaniny konserwującej miały istotny wpływ na końcową liczbę komórek (tabela 2).

Tabela 2. Wyniki analizy wariancji

Summary of ANOVA results for mixture design

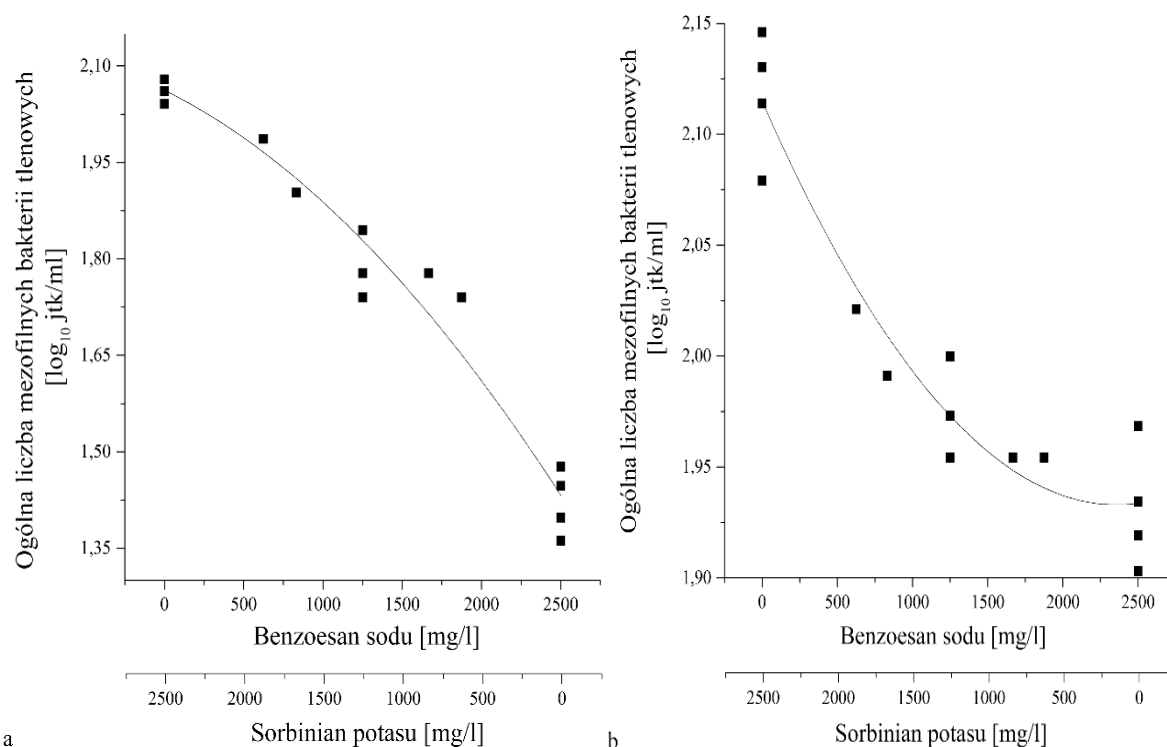
Temperatura	Źródło	SS	df	MS	F	p	Popr.-R ²
4°C	Model	0,882	2	0,441	160,4	< 0,0001	
	Efekty główne (A, B)	0,862	1	0,862	313,5	< 0,0001	
	Interakcja A×B	0,020	1	0,020	7,38	0,018	0,958
	Reszta	0,033	12	0,003			
	Brak dopasowania	0,018	4	0,005	2,55	0,120	
25°C	Model	0,080	2	0,040	72,8	< 0,0001	
	Efekty główne (A, B)	0,072	1	0,072	130,8	< 0,0001	
	Interakcja A×B	0,008	1	0,008	14,73	0,0024	0,911
	Reszta	0,007	12	0,001			
	Brak dopasowania	0,001	4	0,000	0,240	0,907	

Modele regresji wyjaśniały około 90% zmienności. Ich użyteczność do predykcji liczby komórek w przestrzeni wyznaczonej przez badane zmienne niezależne potwierdzono ostatecznie za pomocą testu braku dopasowania (tabela 2). W obu przypadkach wartość prawdopodobieństwa p była większa od 0,05, co jednoznacznie wskazuje, że modele eksperymentalne z zadowalającą jakością opisywały związek pomiędzy zmiennymi niezależnymi i zależnymi, wyrażony za pomocą równań:

$$\log_{10} jtk/ml_{(temp.=4^{\circ}C)} = 5,73 \times 10^{-4}X_1 + 8,24 \times 10^{-4}X_2 + 5,19 \times 10^{-8}X_1X_2 \quad (2)$$

$$\log_{10} jtk/ml_{(temp.=25^{\circ}C)} = 7,73 \times 10^{-4}X_1 + 8,45 \times 10^{-4}X_2 - 3,27 \times 10^{-8}X_1X_2 \quad (3)$$

Poza czynnikami głównymi istotna statycznie była także interakcja pomiędzy stężeniem benzoesu sodu i sorbinianu potasu (A×B).



Rysunek 2. Wykres interakcji benzoesu sodu i sorbinianu potasu dla produktu przechowywanego w temperaturze 4°C (a) oraz 25°C (b)
Interaction plot for sodium benzoate and potassium sorbate for products stored at 4°C (a) and 25°C (b)

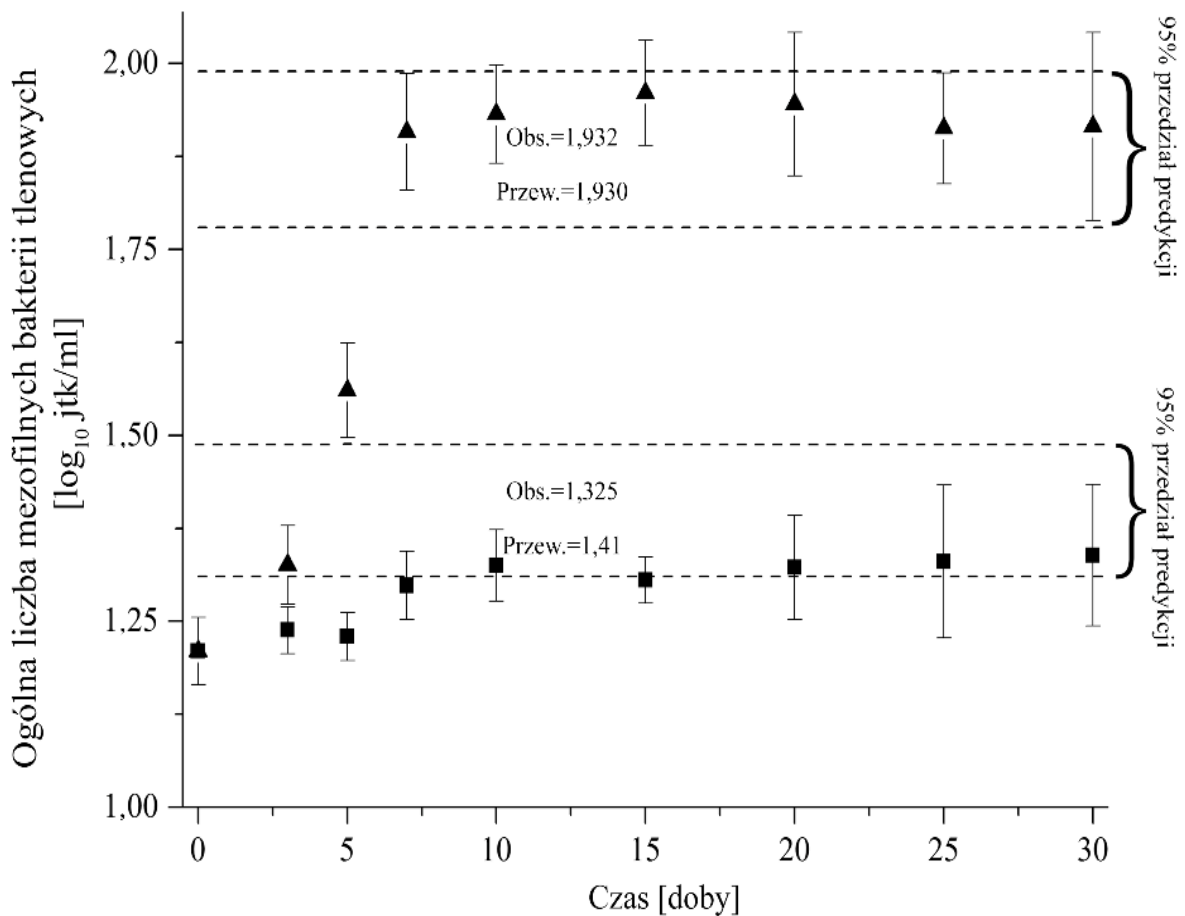
Jak pokazano na rysunku 2a i b, zwiększone stężenie benzoesu sodu w mieszaninie konserwującej, z równoczesnym zmniejszeniem stężenia sorbinianu potasu miało pozytywny wpływ na jej skuteczność. Reszty kwasu benzoesowego wewnątrz komórek bakterii ulegają jonizacji, co w rezultacie prowadzi do zaburzeń w procesie transportu substratów (w tym także aminokwasów) oraz fosforylacji oksydacyjnej w systemie transportu elektronów. Na skutek jonizacji cząsteczki kwasu następuje także uwolnienie protonów wewnątrz komórki i jej zakwaszenie. W rezultacie zmienia się nie tylko przepuszczalność membrany komórkowej, lecz także intensywność wybranych przemian metabolicznych (np. w cyklu Krebsa), co prowadzi do zahamowania wzrostu komórek [Chipley 2005; Davidson i in. 2013]. Według danych literaturowych minimalne stężenie hamujące kwasu benzoesowego (MIC) w przypadku bakterii zawiera się w zakresie od 50 do 3000 mg/l. Odporność drożdży oraz grzybów na ten związek również jest bardzo zróżnicowana. MIC w przypadku *Saccharomyces cerevisiae* wynosi od 20 do 200 (pH 2,6–4,5), tymczasem skuteczna inhibicja wzrostu szczepu *Zygosaccharomyces bailii* wymaga zastosowania stężeń w zakresie 1200–4500 mg/l (pH 4,0–4,8). Spośród grzybów najwyższą odporność na kwas benzoesowy wykazują gatunki

Aspergillus parasiticus (> 4000 mg/l, pH 5,5) oraz *Aspergillus niger* (2000 mg/l, pH 5,0) [Steels i in. 1999; Davidson i in. 2001; Chipley 2005]. Mniejsza aktywność przeciwbakteryjna sorbinianu potasu, w porównaniu z aktywnością benzoesanu sodu, może wynikać z tego, że pewne szczepy bakterii nie są hamowane przez ten związek, a niektóre z nich mogą go nawet metabolizować [Sofos 1989]. Zgodnie z danymi literaturowymi sorbinian potasu jest znacznie bardziej skutecznym inhibitorem wzrostu drożdży oraz pleśni niż bakterii [Sofos 1989; Skirdal i Eklund 1993; Busta i in. 2005]. Efektywność działania konserwantów takich jak słabe kwasy organiczne jest zależna od rodzaju szczepu oraz warunków środowiska (pH, siła jonowa, obecność surfaktantów). Ten sam szczep może wykazywać zróżnicowaną oporność na dany konserwant w zależności od warunków środowiska, w którym bytuje [Busta i in. 2005]. Dlatego każdorazowo należy wykonać serię badań optymalizacyjnych, mających na celu ustalenie rzeczywistych dawek substancji konserwujących wymaganych do skutecznego hamowania wzrostu niepożądanego mikroflory.

Optymalizacja składu mieszaniny oraz walidacja procesu

W celu wyznaczenia optymalnego składu mieszaniny konserwującej wykonano obliczenia optymalizacyjne metodą simpleksu, która doskonale sprawdza się podczas poszukiwania lokalnych minimów funkcji wielu zmiennych [Nelder i Mead 1965]. Zgodnie z tymi obliczeniami produkt powinien zawierać w swoim składzie wyłącznie kwas benzoesowy w stężeniu 2500 mg/l. Nie ma natomiast potrzeby stosowania sorbinianu potasu, co jest bardzo korzystne, biorąc pod uwagę koszty produkcji suplementu opartego na biomase drożdży *Y. lipolytica*. Przewidywana liczba komórek powinna, po 10 dniach przechowywania, wynosić $1,41 \pm 0,13$ i $1,93 \pm 0,11 \log_{10}$ jtk/ml odpowiednio dla prób przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 25°C.

W celu weryfikacji uzyskanych danych przeprowadzono badania walidacyjne zgodnie z nowymi założeniami technologicznymi wynikającymi z optymalizacji oraz z analizy punktów kontrolnych na linii produkcyjnej. Według nowych wytycznych koncentrat benzoesanu sodu dodano do homogenatu komórkowego w trakcie procesu kawitacji hydrodynamicznej, podczas 16 pasażu zawiesiny komórek przez głowicę kawitacyjną. Produkt przechowywano w temperaturze 4°C oraz 25°C przez 30 dni. Zastosowane modyfikacje w procesie produkcji pozwoliły na ujednoczenie homogenatu komórkowego oraz na zmniejszenie stopnia zakażenia obcą mikroflorą podczas rozlewu do opakowań. Produkt zachowywał stabilność w okresie trzykrotnie dłuższym od pierwotnie zakładanego (rysunek 3). Liczebność komórek bakterii mieściła się w przedziale predykcji, wyznaczonym podczas obliczeń optymalizacyjnych, co jednoznacznie potwierdza ich poprawność.



Rysunek 3. Zmiany w ogólnej liczbie bakterii mezofilnych podczas 30 dni przechowywania w temperaturze 4°C (■) i 25°C (▲)
Changes in the total number of mesophilic bacteria during 30 days of storage at temperatures of 4°C (■) and 25°C (▲)

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Do badań nad poprawą stabilności mikrobiologicznej wybrano benzoosan sodu oraz sorbinian potasu, ponieważ substancje te są dopuszczone do stosowania w żywności oraz paszach (posiadają status GRAS). Wzięto również pod uwagę łatwość wprowadzania ich do produktu, brak smaku, zapachu i barwy oraz niski koszt zakupu. Uwzględniono także fakt, że związki te występują naturalnie w bardzo wielu owocach oraz produktach fermentowanych [Niku-Paavola i in. 1999; Busta i in. 2005; Chipley 2005]. Zgodnie z obowiązującymi regulacjami prawnymi badane konserwanty mogą być stosowane w charakterze dodatków do pasz [70/524/EEC; EC 1831/2003; 2004/C 50/01, 2004]. Ponadto Komisja Europejska wprowadziła w maju 2011 roku regulację dotyczącą zezwolenia na stosowanie benzoesanu

sodu jako dodatku paszowego dla prosiąt odsadzonych od maciory. Zgodnie z opinią przygotowaną przez ekspertów panelu ds. dodatków i produktów lub substancji wykorzystywanych w paszach (FEEDAP), Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), benzoosan sodu w stężeniu 4000 mg/kg paszy jest w pełni bezpieczny dla wskazanego gatunku zwierząt [EFSA Panel 2011]. Badania, które stanowiły podstawę do wprowadzenia wspomnianej dyrektywy, wskazują, że benzoosan jest szybko wydalany i nie podlega akumulacji w organizmie. Poza tym poprawia stosunek przyrostu wagi do ilości pobranej paszy.

W prezentowanej pracy optymalne stężenie benzoosan sodu w homogenacie komórek drożdży *Y. lipolytica*, stanowiącym suplement diety dla zwierząt gospodarskich, wynosiło 2500 mg/l. Wyznaczona dawka optymalna była zatem znacznie niższa od dawek określonych w wymienionych wyżej dokumentach Komisji Europejskiej.

PODZIĘKOWANIA

Badania zrealizowano dzięki środkom finansowym pochodzącym z Projektu pt. „Zastosowanie metod kawitacyjnych w produkcji unikalnego białka paszowego” realizowanego w ramach Programu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju pod nazwą „INNOTECH” w ścieżce programowej HI-TECH” (INNOTECH-K1/HI1/7/159645/NCBR/12).

Autorzy pragną także podziękować Panu Franciszkowi Baszczokowi, dyrektorowi ds. rozwoju firmy Skotan S.A., za wkład merytoryczny w przygotowanie niniejszej publikacji, związany w szczególności z innowacyjnym procesem hydrodynamicznej kawitacji, stosowanym do dezintegracji komórek drożdży *Y. lipolytica*.

PIŚMIENNICTWO

1. Council directive 70/524/EEC concerning additives in feeding-stuffs (1970). Official J. Eur. Comm. L 270/1, 840-856
2. List of the authorised additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs (2004). Official Journal C, 50, 1-144
3. Alnoman M., Udompijtkul P., Paredes-Sabja D., Sarker M. R. (2015). The inhibitory effects of sorbate and benzoate against *Clostridium perfringens* type A isolates. Food Microbiol., 48, 89-98

4. Baszczok F., Rymowicz W. (2011). Microbiological reprocessing of by-products from biodiesel production. Patent nr. US 2011/0111090.
5. Busta F. F., Stopforth J. D., Sofos J. N. (2005). Sorbic Acid and Sorbates. Antimicrobials in Food. Third Edition. CRC Press, 49-90
6. Chipley J. R. (2005). Sodium Benzoate and Benzoic Acid. Antimicrobials in Food. Third Edition. CRC Press, 11-48
7. Cox D. R., Reid N. (2000). Factorial designs. The Theory of the Design of Experiments. Chapman and Hall/CRC.
8. Davidson P. M., Taylor T. M., Schmidt S. E. (2013). Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. Food Microbiology, American Society of Microbiology. W: Davidson P. M., Vijay K. J., Jill K. B. (2001). Antimicrobial Agents, Food Additives, CRC Press.
9. European Union Register of Feed Additives EC 1831/2003, Edition 205 (2015). Appendixes 3e, 4 – 19.02.2015
10. EFSA Panel (2011). EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific Opinion on Safety and Efficacy of Protural (sodium benzoate) as feed additive for weaned piglets. EFSA J., 9 (2), 2005
11. Kwiatek K., Kukier E., Wasyl D., Hoszowski A. (2008). Microbiological quality of compound feedstuffs in Poland. Med. Wet., 64, 949-954
12. Lennerz B. S., Vafai S. B., Delaney N. F., Clish C. B., Deik A. A., Pierce K. A., Ludwig D. S., Mootha V. K. (2015). Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. Mol. Genet. Metab., 114, 73-79
13. Skirdal M., Eklund T. (1993). Microculture model studies on the effect of sorbic acid on *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides* and *Ulocladium atrum* at different pH levels. J. Appl. Bact., 74, 191-195
14. Nelder J. A., Mead R. (1965). A Simplex Method for Function Minimization. Computer J., 7, 308-313
15. Niku-Paavola M. L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., Haikara A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol., 86, 29-35
16. PN-EN ISO 4833-2:2013-12, Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów – Część 2: Oznaczanie liczby metodą posiewu powierzchniowego w temperaturze 30 stopni C

17. PN-EN ISO 6579:2003, Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella spp.*
18. PN-EN ISO 6887-1:2000, Mikrobiologia żywności i pasz – Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych – Ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych
19. PN-EN ISO 7218:2008, Mikrobiologia żywności i pasz – Wymagania ogólne i zasady badań mikrobiologicznych
20. PN-ISO 4831:1998, Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby bakterii z grupy coli – Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby
21. PN-ISO 21527-1:2009, Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni – Część 1: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody wyższej niż 0,95
22. Rymowicz W. (2009). A new strain of *Yarrowia lipolytica* and its use in the industrial reclamation of glycerol fractions obtained during biodiesel production. Patent nr. WO/2009/061225
23. Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W. (2013). Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and Bioenergy*, 48, 148-166
24. Sofos J. N. (1989). *Sorbate Food Preservatives*. Taylor & Francis
25. Steels H., James S. A., Roberts I. N., Stratford M. (1999). *Zygosaccharomyces lentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature. *J. Appl. Microbiol.*, 87, 520-527
26. Tilman D., Cassman K. G., Matson P. A., Naylor R., Polasky S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418, 671-677