

DOROTA ZIELIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, ANTONI GORYL

**MODELE PRZEŻYWALNOŚCI BAKTERII POTENCJALNIE  
PROBIOTYCZNYCH *LACTOBACILLUS CASEI* KN291  
W FERMENTOWANYM NAPOJU SOJOWYM**

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było skonstruowanie prognostycznych modeli wzrostu i przeżywalności bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym, przechowywanym w różnych warunkach temperatury.

Skonstruowano nieliniowe modele prognostyczne charakteryzujące się dobrym dopasowaniem i właściwościami stochastycznymi ocen parametrów. Modele te w zadowalający sposób opisują zachowanie bakterii *L. casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym i mogą służyć do szacowania (prognozowania) liczby bakterii w zależności od czasu przechowywania.

Fermentowany napój sojowy w badanych warunkach przechowywania charakteryzował się odpowiednio dużą liczbą bakterii potencjalnie probiotycznych *L. casei* KN291 (około  $10^9$  jtk/ml), co może gwarantować efekt prozdrowotny po spożyciu 100 g porcji produktu.

**Słowa kluczowe:** mikrobiologia prognostyczna, fermentowany napój sojowy, probiotyki

## Wprowadzenie

Mikrobiologia prognostyczna jest subdyscypliną mikrobiologii żywności zajmującą się opracowywaniem modeli matematycznych opisujących reakcje drobnoustrojów na określone warunki środowiskowe oraz weryfikacją ich zastosowania do przewidywania wzrostu, przeżywalności i inaktywacji mikroorganizmów w żywności, jak również do oceny szybkości ich ujawniania się i niekorzystnego, z punktu widzenia technologii, działania w środowisku [4, 11]. Łączy ona elementy mikrobiologii, matematyki, statystyki, dostarczając informacji o zachowaniu się mikroorganizmów w żywności [13].

---

Mgr inż. D. Zielińska, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, Katedra Techniki i Technologii Gastronomicznej, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C 02-776 Warszawa, dr A. Goryl, Katedra Ekonometrii, Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie, ul. Rakowicka 27, 31-510 Kraków

Jedno z podstawowych założeń nowoczesnej mikrobiologii żywności stanowi stwierdzenie, że wzrost mikroorganizmów jest funkcją żywności jako środowiska. Gatunki bardziej przystosowane do życia w takim środowisku, jakim jest żywność, będą dominujące. W każdym środowisku znaleźć można skończoną liczbę czynników wpływających na fizjologiczne reakcje mikroorganizmów [6]. Zazwyczaj do modelowania wykorzystuje się techniki regresji liniowej i nieliniowej. Niektóre modele i odpowiednie algorytmy wyznaczania parametrów oraz miary jakości dopasowania modeli do danych omówiono np. praca [9]. Należy jednak mieć świadomość, że wszystkie modele muszą być uproszczeniem relacji rzeczywistych, gdyż reprezentują skomplikowany i rozbudowany kompleks biochemicznych procesów zachodzących podczas wzrostu komórki i nie są w stanie przewidzieć wszystkich interakcji, jakie zachodzą pomiędzy komórką mikroorganizmu a czynnikami środowiska w produkcji [3].

Rozwój mikrobiologii prognostycznej, ukierunkowanej dotychczas na opracowywanie modeli dla drobnoustrojów patogennych, stymuluje pracę nad tworzeniem modeli grup drobnoustrojów saprofitycznych, drożdży, pleśni, a także psychrotrofów i innych specyficznych zanieczyszczeń środowiskowych, co może być bardzo przydatne w technologii żywności i w procesach fermentacyjnych [5]. Dopiero niedawno zaczęto kierować uwagę na reakcje biokinetyczne mikroorganizmów korzystnych dla żywności, takich jak bakterie kwasu mlekowego. W przemyśle spożywczym bakterie kwasu mlekowego dodawane są celowo jako kultury starterowe do bazowych produktów, takich jak: mleko, mięso, warzywa, zboża, aby osiągnąć stabilny i bezpieczny produkt końcowy o unikalnych cechach sensorycznych [1].

Przykładami opisanych w literaturze pierwszorzędowych modeli wzrostu bakterii kwasu mlekowego jest model wykładniczy, model lag-wykładniczy i modyfikacje modelu Gompertza, natomiast wśród modeli inaktywacji LAB wyróżnić można model inaktywacji log-liniowy i model Weibulla. Przykłady drugorzędowych modeli wzrostu z jedną zmienną to model Arrheniusa lub Ratkowsky'ego, drugorzędowym modelem inaktywacji ze zmienną temperatury jest model Bigelowa. W przypadku więcej niż jednej zmiennej przykładami mogą być modele wielomianowe i model gamma. Modelami trzeciorzędowymi są np. kombinacje modeli pierwszo- i drugorzędowych (model wzrostu, produkcji kwasu, objętości buforowej (*ang. buffer capacity*)) opisujące fermentacje prowadzone z udziałem bakterii kwasu mlekowego [17].

Celem niniejszej pracy było skonstruowanie prognostycznych modeli wzrostu i przeżywalności bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym przechowywanym w różnych warunkach temperatury.

### **Material i metody badań**

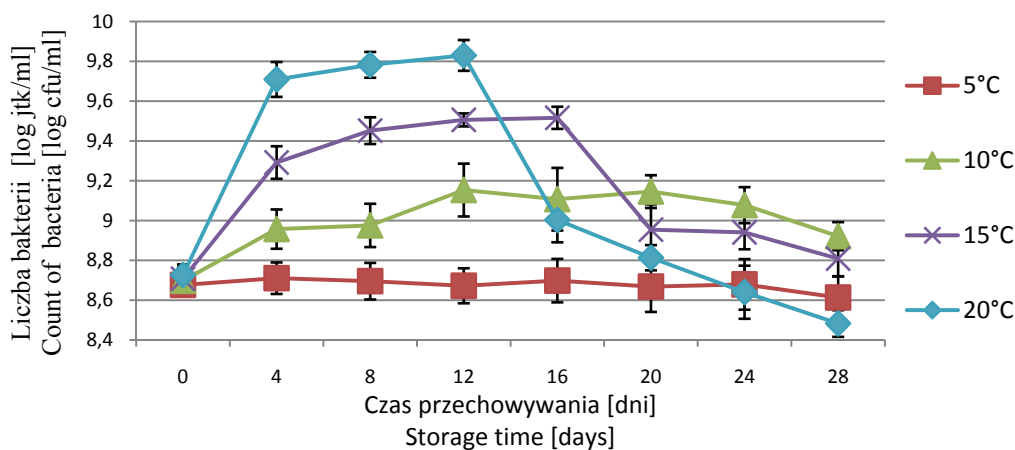
Materiałem do badań był napój sojowy firmy Polgrunt o smaku naturalnym oraz szczep bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus casei* KN291. Do napoju

dodawano 24-godzinne hodowle bakterii i poddawano procesowi fermentacji w temp. 37 °C przez 6 h, a następnie dojrzewaniu w temp. 15 °C przez 48 h. Optymalne warunki fermentacji i dojrzewania ustalono we wcześniejszych badaniach [15, 16]. Początkowa liczba bakterii kwasu mlekowego w zafermentowanym napoju sojowym po okresie dojrzewania wynosiła średnio 8,7 log jtk/ml. Po 15 prób fermentowanego napoju sojowego przechowywano w temperaturze 5, 10, 15 i 20 °C przez 28 dni. W trakcie przechowywania, co 4 dni, badano liczbę bakterii kwasu mlekowego metodą płytkową na podłożu wybiórczym MRS firmy Biokar Diagnostic. Czas inkubacji płytek wynosił 72 h w temp. 30 °C [8].

Wyniki badań przechowalniczych posłużyły do skonstruowania prognostycznych modeli opisujących zachowanie bakterii w funkcji czasu z uwzględnieniem temperatury podczas przechowywania fermentowanego napoju sojowego. Zastosowano funkcje regresji liniowej i nieliniowej. Przyjęto poziom istotności  $p = 0,05$ . Obliczeń dokonano w programie TableCurve 2D Firmy SYSTAT Software Inc.

## Wyniki i dyskusja

Napój sojowy zaszczerpiony bakteriami potencjalnie probiotycznymi *L. casei* KN291 poddawano fermentacji, a następnie dojrzewaniu, tak aby początkowa liczba bakterii wynosiła 8,67 - 8,72 log jtk/ml. Następnie fermentowany napój sojowy przechowywano w różnych wartościach temperatury (rys. 1). Stwierdzono, że liczba bakterii probiotycznych w napoju przechowywanym w temp. 5°C nie zmieniała się istotnie w ciągu 28 dni przechowywania.



Rys 1. Liczba żywych bakterii *L. casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym w czasie przechowywania w temp. 5, 10, 15 i 20 °C przez 28 dni.

Fig. 1. Count of live *L. casei* KN291 bacteria in fermented soy beverage during 28 day storage at 5, 10, 15 and 20 °C.

Natomiast liczba bakterii *L. casei* KN291 podczas 28 dni przechowywania w temp. 10, 15 i 20 °C zmieniała się, początkowo zanotowano jej wzrost, a następnie obniżenie. Im wyższa temperatura przechowywania tym szybciej bakterie namnażały się, a następnie wcześniej i dynamiczniej zamierały (rys. 1). Przebieg zmienności liczby bakterii *L. casei* KN291 w czasie odbiega istotnie od typowego wzrostu s-kształtnego.

Bardzo ważna jest liczba żywych bakterii wprowadzona do organizmu, niezbędna do uzyskania efektu probiotycznego. Według FAO/WHO [2] liczba specyficznej mikroflory w produkcie nie powinna być niższa niż  $10^6$  żywych, aktywnych komórek w 1 gramie lub 1 cm<sup>3</sup> produktu, w całym okresie przydatności produktu do spożycia. W celu uzyskania efektu zdrowotnego należy spożywać taki produkt w ilości nie mniejszej niż 100 g. Dlatego dobra przeżywalność i aktywność bakterii probiotycznych w produkcie są niezbędnymi elementami optymalizacji procesu produkcji żywności probiotycznej [12].

Na podstawie zebranych danych doświadczalnych skonstruowano pierwszorzędowe modele liniowe i nieliniowe opisujące zmiany liczby bakterii w czasie. Modele regresji liniowej nie opisywały z odpowiednią dokładnością zachowania bakterii *L. casei* KN291 w napoju sojowym w czasie przechowywania.

Również pierwszorzędowe równania nieliniowe, powszechnie stosowane do opisywania przeżywalności bakterii w czasie takie jak krzywa Gompertza czy logistyczna oraz modyfikacje tych modeli, nie pozwoliły w zadowalający sposób opisać wzrost i przeżywalność *L. casei* KN291 w napoju sojowym w ciągu 28 dni przechowywania. Poszukiwania odpowiedniego modelu doprowadziły do skonstruowania modeli nieliniowych o postaci:

$$y = 4a \cdot \exp\left(-\frac{x-b}{c}\right) \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{x-b}{c}\right)\right] \quad (1)$$

$$y = a \cdot \exp\left[-\exp\left(-\frac{x-b}{c}\right) - \frac{x-b}{c} + 1\right] \quad (2)$$

z addytywnymi zakłóceniami losowymi.

Modele te wykazały zadowalającą jakość dopasowania i akceptowane właściwości stochastycznych ocen parametrów (tab. 1).

Analiza współczynników determinacji uzyskanych modeli świadczy o dobrym (w przypadku temperatury przechowywania 10 i 15 °C) i umiarkowanym (w przypadku temperatury 5 i 20 °C) dopasowaniu danych do zastosowanych funkcji. Wysoka wartość statystyki F wskazuje, że oceny parametrów asymptotycznie istotnie różnią się od zera, są zatem dostatecznie precyzyjnie oszacowane, aby mieć do nich zaufanie.

Tabela 1

Statystyki funkcji nieliniowych przeżywalności bakterii *L. casei* KN291 w napoju sojowym względem czasu przechowywania.

Statistics of non-linear survival functions of *L. casei* KN291 bacteria in the soy beverage depending on the storage time.

Temp. przechowywania Storage temp. [°C]	Funkcja Function	r <sup>2</sup>	DF Adj r <sup>2</sup>	Fit Std Err	F
5	(1)	0,6853	0,4493	0,0196	5,4442
	(2)	0,6877	0,4535	0,0195	5,5054
10	(1)	0,9261	0,8706	0,0490	31,3140
	(2)	0,9304	0,8782	0,0475	33,4169
15	(1)	0,8414	0,7224	0,1560	13,2620
	(2)	0,8000	0,6501	0,1751	10,0026
20	(1)	0,7786	0,6126	0,3113	8,7924
	(2)	0,7223	0,5140	0,3486	6,5028

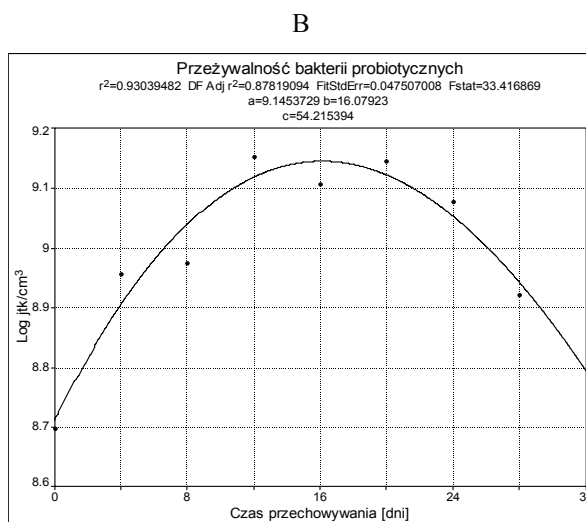
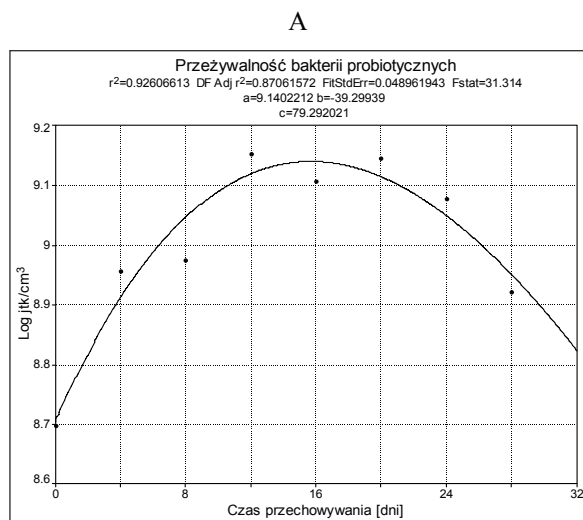
W badaniach Trząskowskiej i wsp. [14], spośród zastosowanych pierwszorzędowych modeli nieliniowych opisujących zmianę liczby bakterii probiotycznych *L. acidophilus* w fermentowanym soku marchwiowym, najlepsze dopasowanie uzyskano stosując funkcję logistyczną i Gomperta ( $r^2 = 0,70$ ).

Na rys. 2. przedstawiono wartości zaobserwowane i oszacowane modeli (1) i (2), przedstawiających przeżywalność drobnoustrojów w napoju sojowym w temp. 10 °C przez 28 dni.

Równie nietypowy przebieg krzywej przeżywalności zaobserwowali hiszpańscy naukowcy [7], którzy badali wzrost planktonu (*Brachionus plicatilis*) na pożywcze z i bez obecności bakterii probiotycznych. W pracy zastosowano trzy modele: uogólniony logistyczny, logistyczno-logistyczny i logistyczny - modyfikacja Gomperta. Najlepiej dopasowanymi modelami opisującymi wzrost planktonu były modele logistyczno-logistyczny ( $r^2 = 0,9946$ ) i uogólniony logistyczny ( $r^2 = 0,9942$ ).

Modele skonstruowane w niniejszej pracy uwzględniają jedną zmienną – czas, który jest mierzonym wskaźnikiem zachowania się bakterii. Przez ekstrapolację można prognozować przeżywalność bakterii w warunkach, które nie były mierzone [10].

Za pomocą otrzymanego modelu (1) obliczono liczbę bakterii *L. casei* KN291 w poszczególnych dniach przechowywania napoju sojowego i porównano oszacowane dane z danymi uzyskanymi w doświadczeniu laboratoryjnym (tab. 2). Zmienność liczby bakterii *L. casei* KN291 w badanym napoju sojowym jest wyjaśniona w 68 – 92 % zmiennością czasu, w zależności od temperatury przechowywania. Przez ekstrapolację oszacowano liczbę bakterii w nie mierzonym 32. dniu przechowywania, w odniesieniu do temp. 5, 10 15 i 20 °C.



a, b, c – parametry funkcji / parameters of function

Rys. 2. Funkcje nieliniowe (A i B) zmiany liczby bakterii *L. casei* KN291 w napoju sojowym w czasie przechowywania w temp. 10°C przez 28 dni.

Fig. 2. Non-linear functions (A and B) of change in the *L. casei* KN291 bacteria count in the soy beverage, stored at 10°C during 28 days.

W celu prognozowania liczby bakterii w warunkach innych niż badane wartości temperatury przechowywania, skonstruowane zostaną drugorzędowe modele powierzchni odpowiedzi, w których zmiennymi niezależnymi będą czas i temperatura przechowywania. Modele te pozwolą na bardziej precyzyjne szacowanie liczby bakterii w produkcji podczas przechowywania w różnych warunkach temperatury i czasu.

Tabela 2

Zestawienie danych empirycznych i oszacowanej liczby bakterii *L. casei* KN291 w napoju sojowym przechowywanym w temperaturze 5, 10, 15 i 20 °C przez 28 i 32 dni.

Listing of empirical and estimated data of the *L. casei* KN291 bacteria count in the soy beverage, stored at 5, 10, 15, and 20°C during 28 and 32 days.

Dzień Day	Temperatura / Temperature							
	5°C		10°C		15°C		20°C	
	E	O	E	O	E	O	E	O
0	8,6764	8,6817	8,6975	8,7043	8,7069	8,7732	8,7265	8,9261
4	8,7105	8,6935	8,9570	8,9108	9,2915	9,2086	9,7090	9,4539
8	8,6954	8,6982	8,9755	9,0462	9,4516	9,4308	9,7824	9,6568
12	8,6724	8,6962	9,1532	9,1198	9,5058	9,4847	9,8296	9,6192
16	8,6982	8,6879	9,1072	9,1401	9,5161	9,4074	9,0031	9,4075
20	8,6680	8,6736	9,1456	9,1143	8,9539	9,2292	8,8132	9,0730
24	8,6792	8,6537	9,0775	9,0491	8,9405	8,9748	8,6400	8,6556
28	8,6132	8,6284	8,9215	8,9504	8,8085	8,6645	8,4827	8,1858
32	-	8,5983	-	8,8233	-	8,3147	-	7,6868

Objaśnienia: / Explanatory notes:

E – dane eksperymentalne / experimental data; O – dane oszacowane / estimated data.

### Wnioski

1. Skonstruowane nieliniowe modele prognostyczne charakteryzują się dobrym dopasowaniem i właściwościami stochastycznymi ocen parametrów. Modele te w zadowalający sposób opisują wzrost i przeżywalność bakterii *L. casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym i mogą służyć do szacowania liczby bakterii w zależności od czasu przechowywania.
2. Fermentowany napój sojowy w badanych warunkach przechowywania charakteryzował się odpowiednio dużą liczbą bakterii potencjalnie probiotycznych *L. casei* KN291 (około  $10^9$  jtk/ml), co może gwarantować efekt prozdrowotny po spożyciu 100 g porcji produktu.

*Praca była prezentowana podczas XIII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Łódź, 28 - 29 maja 2008 r.*

### Literatura

- [1] Caplice E., Fitzgerald G. F.: Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Mikrob.*, 1999, **50**, 131-149.
- [2] Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Raport a Joint FAO/WHO Working Group, 2002.
- [3] Knochel S., Gould G.: Preservation microbiology and safety: Quo vadis? *Trends Food Sci. Technol.* 1995, **6**, 127-131.
- [4] Kołożyn-Krajewska D., Jałosińska-Pieńkowska M.: Założenia, zasady i przyszłość prognozowania mikrobiologicznego. *Żywność Technologia. Jakość*, 1999, **21**, 22-37.
- [5] Kręgiel D., Oberman H.: Prognozowanie bioprocessów. *Przem. Spoż.* 2004, **1 (58)**, 12-14.
- [6] McMeekin T., Olley J., Ross T., Ratkowsky D.: *Predictive microbiology: theory an application.* Research Studies Press, 1993, Taunton.
- [7] Planas M., Vázquez J.A., Marqués J., Pérez-Lomba R., González M.P., Murado M.: Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture* 2004, **240**, 313-329.
- [8] PN-ISO: 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.
- [9] Ratkowsky D.A.: Principles of nonlinear regression modeling. *J. Ind. Microbiol.* 1993, **12**, 195-199.
- [10] Ross T. McMeekin T.A.: Predictive microbiology: application of square root model. *Food Aust.* 1991, **43**, 202.
- [11] Ross T., McMeekin T.: Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 1994, **23**, 241-264.
- [12] Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T.: Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 2000, **84**, 197-215.
- [13] Schaffner D., Labuza T.: Predictive microbiology: where are we and where are we going? *Food Technol.* 1997, **51**, 95-99.
- [14] Trzaskowska M., Kołożyn-Krajewska D., Goryl A.: Prognozowanie wzrostu i przeżywalności bakterii probiotycznych w fermentowanym soku marchwiowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **6 (55)**, 138 – 148.
- [15] Zielińska D.: Dobór szczepów bakterii *Lactobacillus* i ustalenie warunków fermentacji napoju sojowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **2 (43) Supl.**, 289 - 297.
- [16] Zielińska D., Uzarowicz U.: Warunki dojrzewania i przechowywania fermentowanego napoju sojowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **5 (54)**, 186 - 193.
- [17] Zwieterling M.H.: Models and control of bacterial fermentations. In: Health functionality of fermented soybean foods. Ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen 2005, pp. 137-147.

#### SURVIVAL MODELS OF POTENTIALLY PROBIOTIC *LACTOBACILLUS CASEI* KN291 BACTERIA IN A FERMENTED SOY BEVERAGE

##### S u m m a r y

The objective of the study was to develop predictive models of growth and survival of potentially probiotic *Lactobacillus casei* KN291 bacteria in a fermented soy beverage stored at different temperatures.

Non-linear predictive models were developed and they were characterized by proper adjustment and good stochastic properties of the parameters assessed. The models developed satisfactorily describe the



behaviour of *L. casei* KN291 bacteria in the fermented soy beverage and can be used to assess (predict) the storing time-depending bacteria count.

The fermented soy beverage stored under the storage conditions studied was characterized by the adequately large count of potentially probiotic *L. casei* KN291 bacteria (approx.  $10^9$  cfu/ml) and this fact can guarantee a pro-health effect when eating a 100 g portion of the product.

**Key words:** predictive microbiology, fermented soy beverage, probiotics ☒