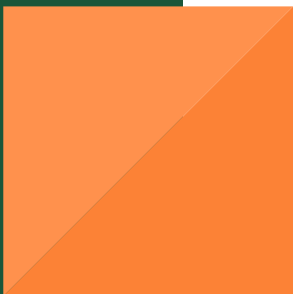


**Charakterystyka, ocena stabilności
mikrobiologicznej i potencjału
antyoksydacyjnego suplementu diety
Probiotyk KWB Nutrition Probio Intimate po
produkcji i w czasie przechowywania**

Data wykonania raportu:
19.08.2025 roku



Wykonawca badań:
Prof. dr hab. Daria Szymanowska



Treść ekspertyzy

CEL BADAŃ

Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka, ocena stabilności (fizyko-chemicznej, organoleptycznej i mikrobiologicznej), potencjału antyoksydacyjnego, aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz profilu kwasów fenolowych i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład produktu po produkcji i w czasie przechowywania.

Badaniom poddano płynny suplement diety Probiotyk KWB Nutrition Probio Intimate zawierający aktywne bakterie probiotyczne i ich metabolity (postbiotyki) jak również zestaw ekstraktów roślinnych.

Testy wykonano z wykorzystaniem gotowego produktu przez okres dwóch miesięcy. Podstawą założeń badawczych była symulacja przyśpieszonych warunków przechowywania jak i stresowych warunków logistycznych. Hipoteza badawcza zakładała, że nowoopracowany produkt będzie stabilny organoleptycznie, fizyko-chemicznie i mikrobiologicznie podczas przechowywania. Uzyskane wyniki badań przedstawiono poniżej.

1. Ogólna charakterystyka produktu

Tab. 1. Ocena organoleptyczna produktu

CECHA		
Wygląd	Smak i zapach	Konsystencja
Płyn o jasnym zabarwieniu	Właściwy dla użytych składników (mieszanki wieloskładnikowej)	Mętny płyn

Tab. 2. Ocena fizyko-chemiczna produktu

OZNACZANY PARAMETR	WYNIK	NORMA	OCENA PARAMETRU Prawidłowy/nieprawidłowy
Sucha masa	Nie większa niż 2%	PN-EN ISO 712	-
Popiół	Nie więcej niż 4%	PN-A-74014/1994	-
Ołów	Nie więcej niż 3 mg/kg	PN-EN 15763:2010	Prawidłowy
Kadm	Nie więcej niż 1 mg/kg	PN-EN 15763:2010	Prawidłowy
Zawartość pestycydów	Zgodna z Rozporządzeniem nr 396/2005	Zgodna z Rozporządzeniem nr 396/2005	Prawidłowy

Tab. 3. Informacje o składnikach alergennych

OZNACZANY PARAMETR	WYNIK		
	Występują	Mogą występować jako zanieczyszczenia krzyżowe	Nie występują
Zboża zawierające gluten (tj. pszenica, żyto, jęczmień, owies zwyczajny, pszenica oplewiona/ orkisz, kamut)	-	-	X
Skorupiaki	-	-	X
Jaja	-	-	X
Ryby	-	-	X
Orzeszki ziemne/orzeszki arachidowe	-	-	X
Nasiona soi	-	-	X
Mleko (włącznie z laktozą)	-	-	X
Orzechy (tj. migdał, orzech laskowy, sezam)	-	-	X
Dwutlenek siarki i siarczyny w stężeniach powyżej 10 mg/kg lub 10 mg/l w przeliczeniu na SO ₂	-	-	X
Łubin	-	-	X
Mięczaki i produkty pochodne	-	-	X

2. Testy przechowalnicze

2. a. Ocena organoleptyczna

Tab. 4. Ocena organoleptyczna produktu w czasie przechowywania w temperaturze 22°C

PUNKT CZASOWY ANALIZY	WSKAŹNIK		
	Wygląd	Smak i zapach	Konsystencja
T0	Płyn o jasnym zabarwieniu	Właściwy dla użytych składników	Mętny płyn
T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
T6	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian

Tab. 5. Ocena organoleptyczna produktu w czasie przechowywania w temperaturze 4°C

PUNKT CZASOWY ANALIZY	WSKAŹNIK		
	Wygląd	Smak i zapach	Konsystencja
T0	Płyn o jasnym zabarwieniu	Właściwy dla użytych składników	Mętny płyn
T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
T6	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian

Tab. 6. Ocena organoleptyczna produktu w czasie przechowywania w temperaturze zmiennej (4/22°C)

PUNKT CZASOWY ANALIZY	WSKAŹNIK		
	Wygląd	Smak i zapach	Konsystencja
T0	Płyn o jasnym zabarwieniu	Właściwy dla użytych składników	Mętny płyn
T2	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
T4	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
T6	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian
T8	Bez zmian	Bez zmian	Bez zmian

2. b. Badanie stabilności mikrobiologicznej

Tab. 7. Badanie stabilności mikrobiologicznej produktu podczas przechowywania w temperaturze 22°C

PUNKT CZASOWY ANALIZY	Oznaczany wskaźnik mikrobiologiczny							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	jtk/g produktu							
T0	$2,7 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T2	$1,4 \times 10^8$	$5,4 \times 10^7$	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T4	$6,4 \times 10^8$	$4,7 \times 10^7$	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T6	$4,5 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T8	$8,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	NB	NB	NB	NB	NB	NB

Tab. 8. Badanie stabilności mikrobiologicznej produktu podczas przechowywania w temperaturze 4°C

PUNKT CZASOWY ANALIZY	Oznaczany wskaźnik mikrobiologiczny							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	jtk/g produktu							
T0	2,7x10 ⁸	3,9x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T2	1,4x10 ⁸	3x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T4	4,0x10 ⁸	2x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T6	4,8x10 ⁸	2,5x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T8	1,2x10 ⁸	3,1x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB

Tab. 9. Badanie stabilności mikrobiologicznej produktu podczas przechowywania w temperaturze zmiennej 22/4°C

PUNKT CZASOWY ANALIZY	Oznaczany wskaźnik mikrobiologiczny							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	jtk/g produktu							
T0	2,7x10 ⁸	3,9x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T2	5,4x10 ⁸	6,0x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T4	5,0x10 ⁸	3,1x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T6	5,1x10 ⁸	2,9x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB
T8	4,5x10 ⁸	2,5x10 ⁷	NB	NB	NB	NB	NB	NB

Legenda:

1 - Ogólna liczba drobnoustrojów (posiew wgłębny); NORMA: PN-EN ISO 4833-1:2013-12 +Ap1:2016-11+A1:2022-06

2 - Liczba bakterii fermentacji mlekowej; NORMA: PN-A-77700:2006

3 - Liczba *Enterobacteriaceae*; NORMA: PN-EN ISO 21528-2:2017-08

4 - Liczba gronkowców koagulazo-dodatnich; NORMA: PN-EN ISO 6888-2:2022-03

5 - Liczba przypuszczalnych *Bacillus cereus*; NORMA: PN-EN ISO 7932:2005

6 - Liczba *Clostridium perfringens*; NORMA: PN-EN ISO 7937:2005

7 - Liczba drożdży i pleśni (aw>0,95); NORMA: ISO 21527-1:2008

8 - Liczba bakterii redukujących siarczany (IV) rosnących w warunkach beztlenowych; NORMA: PN-ISO 15213:2005

NB - Nieobecne

2. c. Ocena biofunkcjonalności produktów

2. c. 1. Ocenę potencjału antyoksydacyjnego oznaczano w następujący sposób:

- **Zdolność dezaktywacji rodników DPPH**

Oznaczenie aktywności przeciwrodnikowej badanych próbek wykonywano metodą spektrofotometryczną z użyciem stabilnego rodnika 2,2'-difenyl-1-pikrylohydrazylu (DPPH). Polegało ono na określeniu stopnia wygaszania rodników DPPH przez zawarte w produktach przeciwutleniacze, czemu towarzyszyło zmniejszenie intensywności barwy purpurowej i przejście w barwę żółtą. Absorbancję próbek, po upływie 30-minutowej inkubacji w temp. $20 \pm 2^\circ\text{C}$ bez dostępu światła, mierzono przy długości $\lambda=517\text{ nm}$ (Metertek SP-830, Tajwan). Zdolność wygaszania wolnych rodników DPPH obliczano z równania:

$$AA = 100 - \frac{(E_w - E_0)}{E_k} \cdot 100 \%,$$

gdzie:

AA - zdolność wygaszania wolnych rodników DPPH [%],

E_w - absorbancja próbki właściwej z roztworem DPPH,

E_0 - absorbancja próbki właściwej bez dodatku roztworu DPPH,

E_k - absorbancja próbki kontrolnej (alkoholowy roztwór DPPH).

- **Zdolność dezaktywacji rodnika ABTS**

Metoda ta polega na redukcji barwnego kationorodnika ABTS [2,2'-azynobis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)] przez obecne przeciwutleniacze w badanych produktach i spektrofotometrycznym (Metertek SP-830, Tajwan) pomiarze zmian stężenia kationorodnika ABTS [2,2'-azynobis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)], po 6 minutach w temperaturze 30°C , przy długości fali 734 nm .

- **Aktywność chelatująca jonów żelaza II**

Badanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) przez składniki badanych próbek przeprowadzono w wodnych roztworach preparatów polifenoli dodając chlorek żelaza (II) i ferrozyn. Absorbancję barwnego kompleksu mierzono po 10 min od dodania ferrozyny przy długości fali 562 nm , w spektrofotetrze Shimadzu UV- 160A.

Ogólna zawartość polifenoli

Ogólną zawartość polifenoli w próbkach oznaczano przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu'a. Metoda polegała na pomiarze zmiany barwy żółtego odczynnika Folina-Ciocalteu'a zredukowanego grupami hydroksylowymi związków fenolowych w środowisku węglanu sodu na barwę niebieską. Absorbancję próbek mierzono przy użyciu spektrofotometru firmy Metertek SP-830 (Tajwan), przy długości fali $\lambda=765\text{ nm}$. Do wykreślenia krzywej kalibracyjnej użyto roztworów alkoholowych kwasu galusowego jako wzorca ($r=0,99$). Wyniki wyrażano jako równoważnik kwasu galusowego (GAE) w mg/g suchej masy próby.

Tab. 10. Właściwości antyoksydacyjne i zawartość polifenoli w czasie przechowywania w temperaturze 22°C

PUNKT CZASOWY ANALIZY	POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY			Stężenie polifenoli ogółem (mg/g s.m.)
	DPPH mmol Tx/g s.m	ABTS mmol Tx/g s.m	Aktywność chelatująca 1500 ppm (%)	
T0	3,1	6,3	18,4	28,1
T2	3,5	6,2	18,9	27,1
T4	3,6	6,9	18,3	26,0
T6	3,6	6,0	17,6	26,8
T8	3,9	6,9	17,7	26,0

Tab. 11. Właściwości antyoksydacyjne i zawartość polifenoli w czasie przechowywania w temperaturze 4°C

PUNKT CZASOWY ANALIZY	POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY			Stężenie polifenoli ogółem (mg/g s.m.)
	DPPH mmol Tx/g s.m	ABTS mmol Tx/g s.m	Aktywność chelatująca 1500 ppm (%)	
T0	3,1	6,3	18,4	28,1
T2	3,6	6,0	17,6	27,0
T4	3,5	6,4	17,9	27,9
T6	3,5	6,2	17,9	27,2
T8	3,7	6,9	17,9	27,8

Tab. 12. Właściwości antyoksydacyjne i zawartość polifenoli w czasie przechowywania w temperaturze zmiennej 22/4°C

PUNKT CZASOWY ANALIZY	POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY			Stężenie polifenoli ogółem (mg/g s.m.)
	DPPH mmol Tx/g s.m	ABTS mmol Tx/g s.m	Aktywność chelatująca 1500 ppm (%)	
T0	3,1	6,3	18,4	28,1
T2	3,5	6,2	16,9	29,1
T4	3,6	6,0	16,6	27,9
T6	3,5	6,4	16,9	27,1
T8	3,5	6,2	16,3	26,0

2. c. 2. Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych wobec mikroorganizmów patogennych

Metodyka. W celu oznaczenia antagonizmu produktów zawierających drobnoustroje probiotyczne względem mikroorganizmów wskaźnikowych przeprowadzono badania, które obejmowały przygotowanie mikroorganizmów wskaźnikowych i badanie aktywności izolatów metodą studzienkową. W testach wykorzystano mikroorganizmy wskaźnikowe wymienione w tabeli poniżej. Szczepy wskaźnikowe przeniesiono do probówek zawierających 10 ml podłoża bulionowego z dodatkiem 2% glukozy (w celu namnożenia biomasy). Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie w celu uzyskania wyraźnej warstwy murawkowej, upłynnione podłoże agarowe zaszczerpiono 10% (v/v) 24-godziną hodowlą kultury wskaźnikowej i wylano na płytki Petriego. Na powierzchnię stałej pożywki zaszczerpionej mikroorganizmami wskaźnikowymi наносono punktowo 20 µL badanego produktu. Inkubację prowadzono w 37°C przez 24 godziny, w warunkach beztlenowych lub względnie beztlenowych. Następnie mierzono średnice strefy zahamowania lub ograniczenia wzrostu bakterii wskaźnikowych. Zahamowanie wzrostu mikroorganizmu wskaźnikowego, przejawiające się całkowitym przejaśnieniem wokół miejsca naniesienia płynu hodowlanego świadczyło o aktywności bakteriobójczej badanego szczepu. O właściwościach bakteriostatycznych orzekano na podstawie zmniejszenia gęstości murawki (ograniczenie wzrostu szczepu wskaźnikowego).

Tab. 13. Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych produktu wobec mikroorganizmów patogennych

Badany produkt	Oznaczany wskaźnik mikrobiologiczny							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Strefa zahamowania wzrostu (mm)							
	Nw	9,0±1,0	3,0±0,0	9,0±1,0	2,0±0,0	3,0±1,0	8,0±1,0	2,0±0,0

Legenda:

1. *Clostridium butyricum* ATTC 860
 2. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644
 3. *Enterococcus faecalis* ATTC 29212
 4. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 5. *Escherichia coli* ATCC 25922
 6. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
 7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 8. *Candida albicans* ATTC 10231 39 16
- Nw- Nie wykazano

Wnioski: Badany produkt wykazuje największe właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.

2. c. 3. Ocena profilu kwasów fenolowych i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład produktu

Metodyka. Oznaczenia kwasów fenolowych w tym kwasu galusowego, waniliny, p-hydroksybenzoesowego, α -tokoferolu oraz katechiny wykonano przy długości fali równej 280 nm; retinolu, kwasów kawowego, p-kumarowego, synapowego, oraz ferulowego przy 320 nm; witeksyny przy 340 nm, rutyny, kemferolu i kwercetyny przy 360 nm, niacyny, ryboflawiny przy 260 nm, natomiast kw. chlorogenowego przy 255 nm. Związki fenolowe rozdzielano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w kolumnie SB-C18 (50 mm x 4,6 mm o średnicy cząstek równej 1,8 μ m, Agilent) w temperaturze 30°C. Jako eluent stosowano: A: woda : kw. octowy (98:2), B: metanol: kw. octowy (98:2) przy przepływie 0,75 ml/min, w gradiencie: 0 min 1%B, 22 min 40%B, 26 min 40%B, 28 min 100%B, 35 min 100% B, 36 min 1% B. Próby nanoszono na kolumnę w ilości 10 μ l. Obliczenia ilościowe wykonano wykorzystując powierzchnie pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem programu OpenLab CDS).

Tab. 14. Stężenie kwasów fenolowych w produkcie

Badany produkt	GAL	WAN	BEN	TOK	KAT	RET	KAW	KUM
	mg/100 g produktu							
	1,2	2,8	1,2	1,8	0,4	1,1	1,0	0,3
Badany produkt	SYN	WIN	FER	RUT	KEM	KWE	RYB	NIA
	mg/100 g produktu							
	1,2	1,2	1,2	2,8	0,2	2,8	0,5	0,2

Legenda:

GAL - kwas galusowy

WAN - wanilina

BEN - kwas p-hydroksybenzoesowy

TOK- α -tokoferol

KAT- katechiny

RET - retinol

KAW - kwas kawowy

KUM - kwas p-kumarowy

SYN-kwas synapowy

FER - kwas ferulowy

WIN - witeksyna

RUT - rutyna

KEM - kemferol

KWE - kwercetyna

NIA- niacyna

RYB - ryboflawina

ND - nie oznaczono

Tab. 15. Stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i innych związków, metabolitów drobnoustrojów probiotycznych

Badany produkt	OCT	MLE	PRO	IZO	MAS	KAP	KAR	1,2-PD
	mg/100 g produktu							
	1,2	1200	12	55	43	0,16	0,34	0,2

Legenda:

OCT - kwas octowy
MLE - kwas mlekowy
PRO - kwas propionowy
IZO - kwas izomastowy
MAS - kwas masłowy
KAP - kwas kapronowy
KAR - kwas kaprylowy
1,2-PD-1,2 propanediol

WNIOSKI KOŃCOWE

Produkt Probiotyk KWB Nutrition Probio Intimate, płynny suplement diety, wykazuje stabilność fizykochemiczną, organoleptyczną, mikrobiologiczną i funkcjonalną zarówno po produkcji, jak i podczas przechowywania w warunkach chłodniczych.

W badaniach potwierdzono także brak zanieczyszczeń składnikami alergennymi, w związku z czym produkt jest bezpieczny do spożycia dla konsumentów z występującymi alergiami pokarmowymi.

W przeprowadzonych badaniach wykazano również, że produkt charakteryzuje się udokumentowaną aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec wybranych patogenów, w tym *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, co potwierdza jego potencjał we wspieraniu naturalnej ochrony organizmu przed niektórymi drobnoustrojami. W przeprowadzonych badaniach wykazano również, że produkt wyróżnia się bogatym profilem bioaktywnych kwasów fenolowych oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, które powstają wyłącznie w wyniku fermentacji podczas produkcji płynnych preparatów probiotycznych. Obecność tych metabolitów stanowi istotną przewagę technologii płynnej nad liofilizatami i przekłada się na unikalną wartość funkcjonalną produktu, wspierającą mikrobiom i ogólną kondycję organizmu.

W badaniach organoleptycznych produkt uzyskał wysokie oceny pod względem smaku i zapachu, co świadczy o jego wysokim stopniu pożądalności.

Autor raportu: prof. dr hab. Daria Szymanowska