

Autoreferat

Opis dorobku i osiągnięć naukowych

1. Imię i nazwisko

Piotr Kołakowski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Dyplom magistra inżyniera technologii żywności, specjalność technologia mleczarska – uzyskany na Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie (1988)

Dyplom doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności – uzyskany na Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie, Wydział Technologii Żywności, Instytut Biotechnologii Żywności (1997)

Tytuł rozprawy: Biosynteza, charakterystyka i zastosowanie enzymów *Rhizomucor miehei* N-I w przemyśle mleczarskim

Promotor: prof. dr hab. Arnold Rejs

Dyplom Managera Jakości – uzyskany na Uniwersytecie Warmińsko – Mazurskim w Olsztynie w ramach studiów podyplomowych (2008)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

2012-	Dyrektor Zakładu – Danisco Biolacta w likwidacji w Olsztynie
2010- 2012	Dyrektor Zakładu, Dyrektor R&D, Prezes Zarządu – Danisco Biolacta w Olsztynie
2004 -2010	Dyrektor Zakładu, Dyrektor R&D, Członek Zarządu – Danisco Biolacta w Olsztynie
2003- 2004:	Dyrektor Techniczny - Rhodia Food Biolacta w Olsztynie
1999- 2003:	Kierownik Wydziału Badań i Rozwoju - Rhodia Food Biolacta w Olsztynie
1998-1999:	Staż podoktorski - Uniwersytet Montpellier II, Laboratorium Biochemii i Technologii Spożywczej, Montpellier, Francja
1997- 1998:	Adiunkt - Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie, Wydział Technologii Żywności, Instytut Biotechnologii Żywności

1991 - 1997: Asystent – Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, Wydział Technologii Żywności, Instytut Biotechnologii Żywności

1988 - 1991: Doktorant – Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, Wydział Technologii Żywności, Instytut Biotechnologii Żywności

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65. Poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

„Identyfikacja dotychczas niepoznanych właściwości technologicznych i mikrobiologicznych ziaren kefirowych oraz poprawa jakości kefiru”

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

b1 Publikacje

- 1. Kołakowski, P., Ozimkiewicz, M. (2012)** Restoration of kefir grains subjected to different treatments. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 140-145.
- 2. Kołakowski, P., Ozimkiewicz, M. (2012)** Kefir grains tolerance to *Escherichia coli* contamination – industrial advantages. *Dairy Science & Technology*, 92(6), 709-718.
- 3. Kołakowski, P., Malinowska, M., Gerlich, J. (2010)** The use of transoligosaccharide (TOS) propionate agar medium with mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in dairy cultures and in fermented dairy products. *Milchwissenschaft Milk Science International*, 65(4), 380-384.
- 4. Kołakowski, P., Pawlikowska, K. (2012)** Kefir as a probiotic delivery vehicle. *Milchwissenschaft Milk Science International*, 67(2), 159-162.
- 5. Kowalczyk, M., Kołakowski, P., Radziwiłł-Bieńkowska, J.M., Szmytkowska, A., Bardowski, J. (2012)** Cascade cell lyses and DNA extraction for identification of genes and microorganisms in kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 79, 26-32.

b2 Patenty

- 6. Obert, J-P., Kołakowski, P. (2008)** Process for seeding a media with microorganism

in form of a tablet. United States Patent Application Publication No. US2008/0193594 A1 and European Patent, No. 05739386.0-2114-IB2005001458, proprietier Danisco A/S.

b3 Wdrożenia przemysłowe kultur kefirowych w kierowanych przez habilitanta projektach realizowanych w Wydziale Badań i Rozwoju firmy Danisco Biolacta Sp. z o.o.

- | | |
|------------------------|--------|
| 7. CHOOZIT KefirMild | (2004) |
| 8. Vital Kefir | (2007) |
| 9. HOWARU Kefir Bifido | (2008) |
| 10. CHOOZIT Kefir C3 | (2010) |

c) omówienie celu/naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

I. Wstęp

Kefir jest jednym z najstarszych mlecznych napojów fermentowanych, którego sposób otrzymywania i mikroflora kształtowała się przez wiele stuleci. Ojczyzną kefiru jest Kaukaz. Jego produkcję w skali przemysłowej rozpoczęto w Rosji w końcu XIX wieku. Podstawą produkcji kefiru są ziarna kefirowe. Ziarna kefirowe składają się z, żyjących w ścisłej symbiozie, około 30 gatunków bakterii i drożdży. Wśród nich znajduje się szereg gatunków bakterii kwasu mlekowego (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* etc) i drożdży o uznanych powszechnie cechach terapeutycznych i leczniczych. Na właściwości zdrowotne kefiru ma też wpływ ogromna ilość wytwarzanych w procesie fermentacji metabolitów w skali jakościowej i ilościowej często niespotykanych w innych produktach mleczarskich. Jednak produkcja tradycyjnego kefiru (fermentacja i dojrzewanie) trwa ponad 35 godzin a jego termin przydatności do spożycia wynosi zaledwie trzy dni. Popularyzacja kefiru i jego utrzymanie na rynku wymaga ogromnych nakładów na badania w kierunku opracowania kultur startowych na bazie ziaren kefirowych pozwalających uzyskać produkt charakteryzujący się:

- a) czasem fermentacji mleka nie przekraczającym 16 godzin;
- b) porównywalnym do jogurtu terminem przydatności do spożycia;
- c) ograniczoną produkcją gazu i ograniczonymi zmianami sensorycznymi w trakcie przechowywania;

- d) powtarzalnymi parametrami produkcji i jakości gotowego wyrobu w długim horyzoncie czasowym;
- e) podwyższoną lepkością;
- f) dodatkowymi właściwościami zdrowotnymi uzyskanymi poprzez wzbogacenie szczepami probiotycznymi.

Jednak podstawowym wyjściowym etapem do uzyskania sukcesu jest opracowanie standardowego procesu produkcji ziaren kefirowych o wysokiej stabilności mikrobiologicznej i niezmiennych parametrach technologicznych.

II. Cel i zakres badań

Celem prowadzonych badań było:

- Poszukiwanie mikrobiologicznych i technologicznych wyróżników jakości ziaren kefirowych;
- Optymalizacja warunków hodowli, przechowywania i regeneracji ziaren kefirowych;
- Określenie mikrobiologicznego bezpieczeństwa i technologicznych właściwości ziaren kefirowych namnażanych w mleku poddanym kontaminacji mikrobiologicznej;
- Oszacowanie bioróżnorodności mikrobiologicznej ziaren kefirowych metodą kaskadowej lizy komórek i ekstrakcji DNA;
- Opracowanie selektywnych metod oznaczania bakterii probiotycznych w kulturach kefirowych i kefirze;
- Konstruowanie nowej generacji funkcjonalnych kultur kefirowych na bazie liofilizowanych ziaren kefirowych, bakterii kwasu mlekowego, bakterii probiotycznych i drożdży dla rozwoju rynku kefirowego w kraju i za granicą;
- Opracowanie kultury kefirowej wygodnej do użycia w domowej produkcji kefiru.

III. Dokumentacja wyników i wnioski

IIIa Publikacje

Kołąkowski, P., Ozimkiewicz, M. (2012) Restoration of kefir grains subjected to different treatments. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 140-145.

Celem badań była ocena zdolności regeneracyjnych ziaren kefirowych, poddanych zróżnicowanej obróbce, w mleku poprzez codzienne ich pasażowanie. Analizując wpływ

procesów: homogenizacji, zamrażania w ciekłym azocie i zamrażalniczego przechowywania, przechowywania w warunkach chłodniczych, liofilizacji oraz przemywania wodą na ziarna kefirowe odkryto ich wysokie zdolności regeneracyjne.

Za najważniejsze rezultaty badań prezentowane w tej publikacji uważam:

- Opracowanie efektywnego sposobu regeneracji ziaren kefirowych w wymiarze ich właściwości technologicznych w oparciu o wyróżnik dynamiki ich wzrostu w mleku. Czas regeneracji ziaren wahał się w szerokich granicach i zależał od zastosowanego procesu.
- Określenie optymalnych sposobów przechowywania ziaren kefirowych. Niska temperatura przechowywania ziaren kefirowych była najlepszą metodą zachowania ich jakości. Ziarna kefirowe zamrożone w ciekłym azocie a następnie przechowywane w -50°C przez 10 lat w pełni się zregenerowały w aspekcie dynamiki wzrostu w mleku, rozmiaru i równowagi mikrobiologicznej po 12 kolejnych pasażach w mleku.
- Odkrycie zjawiska odbudowy rozmiaru i struktury ziaren kefirowych rozdrobnionych mechanicznie. Ziarna kefirowe poddane homogenizacji w Stomacherze z rozmiarów o średnicy 0,5 – 2,5 cm do 0,1 – 0,3 cm całkowicie odzyskały pierwotne rozmiary po 14 pasażach w mleku.
- Odkrycie warunków nieodwracalnej utraty zdolności odbudowy struktury ziaren kefirowych pomimo zachowania ich pełnej aktywności biologicznej. Ziarna kefirowe poddane procesowi liofilizacji a następnie mieleniu nie były w stanie odtworzyć swojej struktury w procesie pasażowania w mleku.

Uzyskane rezultaty mają duże znaczenie praktyczne dla bezpieczeństwa produkcji ziaren kefirowych, utrzymania wysokiej jakości startowych kultur kefirowych jak również dla zarządzania kosztami ich produkcji w zakładach czystych kultur mleczarskich. Dotychczasowa praktyka produkcji ziaren kefirowych opiera się na ciągłym codziennym ich pasażowaniu w mleku. Jedynym ze sposobów oddziaływania na wydajność namnażania (na zmniejszenie lub zwiększenie ilości produkowanych ziaren) było głównie zmniejszenie lub zwiększenie ilości stosowanego mleka. Otrzymane rezultaty dają gwarancję powrotu do wysokiej jakości produkcji ziaren nawet w wyniku kilkumiesięcznej przerwy w produkcji spowodowanej awarią urządzeń, sezonowością lub załamaniem rynku. Opracowana i zastosowana z sukcesem procedura umożliwia przechowanie ziaren kefirowych a następnie

ich regenerację do stanu pełnej aktywności metabolicznej i technologicznej. Wyniki przeprowadzonych badań są również cenną informacją dla producentów kefiru, którzy prowadzą propagację ziaren kefirowych bezpośrednio w zakładach.

Kołąkowski, P., Ozimkiewicz, M. (2012) Kefir grains tolerance to *Escherichia coli* contamination – industrial advantages. *Dairy Science & Technology*, 92(6), 709-718.

W publikacji przedstawiono wpływ kontaminacji mleka bakteriami *E. coli* na jakość mikrobiologiczną kefiru i użytych do jego produkcji ziaren kefirowych.

Za najważniejsze rezultaty badań prezentowane w tej publikacji uważam:

- Wykazanie przeciwbakteryjnego działania ziaren kefirowych wobec *E. coli*;
- Wykazanie możliwości ponownego zastosowania do produkcji kefiru ziaren kefirowych wydzielonych z kontaminowanego bakteriami *E. coli* mleka przerobowego poddanego fermentacji z ich udziałem.

W ziarnach kefirowych wydzielonych z kontaminowanego mleka nie stwierdzono obecności *E. coli*.

W dotychczasowej praktyce przemysłowej obecność bakterii z grupy coli w mleku fermentowanym ziarnem kefirowym skutkowałą natychmiastową utylizacją ziaren kefirowych, co wiązało się z dużymi stratami. Uruchomienie produkcji z nowej partii ziaren jest procesem kilkutygodniowym i czasami powoduje poważne zakłócenia technologiczne. Przy niewielkiej kontaminacji mleka wydzielone ziarna kefirowe po kilkukrotnym przemyciu jałową wodą mogą być ponownie użyte w procesie produkcji kefiru bądź kultur kefirowych.

Kołąkowski, P., Malinowska, M., Gerlich, J. (2010) The use of transoligosaccharide (TOS) propionate agar medium with mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in dairy cultures and in fermented dairy products. *Milchwissenschaft Milk Science International*, 65(4), 380-384.

Jedną z przeszkód w powszechniejszym stosowaniu probiotyków w przemyśle mleczarskim, a w szczególności *Bifidobacterium* spp., są trudności w ich selektywnym oznaczaniu w kulturach i produktach mleczarskich. Populację *Bifidobacterium* spp. szczególnie trudno jest oznaczyć w kefirze i kulturach kefirowych. Uzyskane w niniejszej pracy rezultaty potwierdzają wysoką selektywność podłoża TOS do ilościowego oznaczania bakterii z rodzaju

Bifidobacterium przy odpowiedniej koncentracji mupirocyny, w szerokim zakresie kultur i produktów mleczarskich włącznie z kefirem i kulturami kefirowymi. Populacja *Bifidobacterium* spp. oznaczana na podłożu TOS charakteryzowała się wysoką odpornością na stężenie mupirocyny (MIC > 300 µg/ml), podczas gdy bakterie z rodzaju *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus* były wrażliwe na ten antybiotyk (MIC < 100 µg/ml dla większości badanych szczepów). Na podłożu TOS *Bifidobacterium* spp. tworzyły duże kolonie o średnicy powyżej 1 mm i mupirocyna nie wpływała na ich rozmiar. Bakterie kwasu mlekowego na podłożu TOS tworzyły kolonie znacznie mniejsze, które malały wraz ze wzrostem stężenia mupirocyny i już przy jej koncentracji 50 µg/ml ich rozmiary nie przekraczały 0,5 mm. Na podłożu TOS z dodatkiem 50 µg/ml mupirocyny oznaczano ponad 95% populacji *Bifidobacterium* spp. obecnych w kulturze kefirowej lub kefirze.

Kołąkowski, P., Pawlikowska, K. (2012) Kefir as a probiotic delivery vehicle. *Milchwissenschaft Milk Science International*, 67(2), 159-162.

Wykazano, na przykładzie 3 probiotycznych szczepów (*Bifidobacterium lactis* HN019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 i *Lactobacillus acidophilus* NCFM), że kefir może być doskonałym nośnikiem korzystnych dla zdrowia człowieka bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Dodatek probiotyków do mleka nie wpływał negatywnie na przebieg procesu fermentacji i jakość kefiru. Wyniki badań mogą mieć wpływ na poprawę prozdrowotnego wizerunku kefiru.

Kowalczyk, M., **Kołąkowski, P.**, Radziwiłł-Bieńkowska, J.M., Szmytkowska, A., Bardowski, J. (2012) Cascade cell lyses and DNA extraction for identification of genes and microorganisms in kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 79, 26-32.

Większość badań dotyczących bioróżnorodności kefiru i ziaren kefirowych jest oparta na klasycznych metodach mikrobiologicznych z zastosowaniem selektywnych podłoży. Uzyskane rezultaty identyfikacji mikroorganizmów metodami klasycznymi mogą być niepełne, ponieważ niektóre drobnoustroje nie dają się namnażać. Techniki molekularne otwierają nowe możliwości identyfikacji kompozycji mikrobiologicznej ziaren kefirowych. Optymalizując warunki izolacji DNA z ziaren kefirowych metodą kaskadowej lizy komórek w celu efektywnej identyfikacji genów i oceny ich mikrobiologicznej bioróżnorodności uzyskano

pięć ekstraktów różniących się profilami DNA potwierdzonych ich zróżnicowaną kompozycją mikrobiologiczną metodą RAPD. Za najważniejsze osiągnięcie opisane w tej publikacji uważam opracowanie kaskadowej lizy komórek ułatwiającej analizę bioróżnorodności kompleksów mikrobiologicznych zawierających bakterie fermentacji mlekowej i drożdże: ziarna kefirowe, sery, piwo. Zastosowanie kaskadowej lizy komórek do izolacji DNA bakterii kwasu mlekowego i drożdży może być również przydatne w biotechnologii żywności do monitorowania jakości fermentowanych produktów np. serów dojrzewających, piwa itp.

Z wyjątkiem publikacji, gdzie pierwszym autorem jest M. Kowalczyk we wszystkich pozostałych publikacjach jestem autorem korespondującym.

IIIb Patenty

Obert, J-P., **Kołąkowski, P.** (2008) Process for seeding a media with microorganism in form of a tablet. United States Patent Application Publication No. US2008/0193594 A1 and European Patent, No. 05739386.0-2114-IB2005001458, proprietier Danisco A/S.

Opracowano skład mieszanki do produkcji wysoko-aktywnych, z długim terminem przydatności do użycia, kultur jogurtowych i kefirowych w formie tabletek do produkcji napojów fermentowanych. Tabletki kefirowe w swoim składzie zawierają probiotyczny szczep *Lactobacillus acidophilus* NCFM i są rekomendowane do domowej produkcji kefiru. Tabletki charakteryzują się zdolnością szybkiego roztwarzania w wodzie lub mleku. Dla osób nietolerujących mleko mogą być stosowane po roztworzeniu w wodzie lub używane bezpośrednio do ssania. W skład kultury kefirowej „Tybet kefir” wchodzi następujące składniki: ziarno kefirowe, CHOOZIT BT001 (bakterie z rodzaju *Lactococcus*) i *Lactobacillus acidophilus* NCFM.

Skład stosowanej do kompresji mieszanki (produkcji tabletek) jest następujący:

- 1% stearynian magnezu;
- 2% kroskarmeloza sodu;
- 4% glikolan sodu;
- 53% celuloza mikrokrystaliczna;
- 40% liofilizowana kultura kefirowa („Tybet kefir”).

Otrzymana mieszanina jest bezpośrednio poddawana kompresji przy użyciu ciśnieniowej maszyny do tabletkowania (ciśnienie 60 MPa, masa tabletki 0,5g, średnica tabletki 0,8 cm).

Kompresja nie wpływa na zmiany właściwości funkcjonalnych kultury kefirowej. Rekomendowaną dawką do użycia jest zastosowanie jednej tabletki kefirowej na jeden litr mleka. Tabletki przechowywane w suchym i chłodnym miejscu mają, co najmniej dwuletni termin przydatności do użycia.

IIIc Wdrożenia przemysłowe

W kierowanym przeze mnie zespole badawczo-rozwojowym zostały opracowane i wprowadzone na rynek globalny kultury kefirowe (własność Rhodia Food i ich następców prawnych):

CHOOZIT KefirMild – rok 2004 – koncepcja oparta o liofilizowane mezo-termofilne szczepy bakterii fermentacji mlekowej (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* i *Streptococcus thermophilus*) z włączeniem do kompozycji szczepów termofilnych produkujących egzopolisacharydy i szczepów wyizolowanych z ziaren kefirowych. Kultura jest zalecana do produkcji naturalnego napoju kefirowego bez stosowania dodatku substancji stabilizujących i zagęszczających. Kultura pozwala uzyskać napój mleczny o długim terminie przydatności do spożycia (do czterech tygodni), łagodnym, lekko kefirowym smaku, podwyższonej lepkości i stosunkowo krótkiej strukturze. Smak kefirowy uzyskano poprzez wzbogacenie kultury wyizolowanymi szczepami z rodzaju *Lactococcus* z ziaren kefirowych. Kultura została opracowana w dwóch wariantach fagowych.

Vital Kefir – rok 2007 – kultura opracowana w oparciu o liofilizowane ziarno kefirowe i probiotyczne szczepy z rodzaju *Lactobacillus* do domowej produkcji kefiru. Kultura jest aktywna w szerokim zakresie temperatur i pozwala uzyskać tradycyjny, wysokiej jakości kefir wzbogacony w szczepy probiotyczne w warunkach domowych bez specjalistycznego wyposażenia. Kultura jest dostępna w opakowaniach przeznaczonych do produkcji od 1 do 3 litrów kefiru. Kefir może być produkowany z mleka krowiego, owczego, koziego, wielbłądziego jak również jego substytutów w postaci mleka ryżowego lub sojowego.

HOWARU Kefir Bifido – rok 2008 – kultura opracowana w oparciu o liofilizowane ziarno kefirowe i probiotyczny szczep *Bifidobacterium lactis* HN019. Kultura zapewnia około 10⁷

jednostek tworzących kolonie (jtk) szczepu *Bifidobacterium lactis* HN019 w 1 ml kefiru. Kultura została opracowana w dwóch wariantach fagowych.

CHOOZIT Kefir C3 – rok 2010 – kultura przeznaczona do produkcji tradycyjnego kefiru metoda termostatową jak również metoda zbiornikową w oparciu o liofilizowane ziarno kefirowe. Kultura charakteryzuje się bardzo wysokim udziałem w swoim składzie liofilizowanych ziaren kefirowych. Pozwala uzyskać kefir o tradycyjnych właściwościach, trzytygodniowym terminie przydatności do spożycia, a jednocześnie ograniczonej produkcji gazu w trakcie przechowywania.

Ponadto jestem autorem kilku rozwiązań technologicznych w procesie produkcji kefiru, które stanowią tajemnicę handlową.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

5.1 Mikrobiologiczna biosynteza, charakterystyka i zastosowanie enzymów w serowarstwie

W latach 1988 – 1995 jako doktorant a następnie asystent Instytutu Biotechnologii Żywności prowadziłem badania w zakresie optymalizacji biosyntezy, wydzielania, oczyszczania, charakterystyki i zastosowania w serowarstwie enzymów grzyba strzępkowego *Rhizomucor miehei* N-I. Badania prowadziłem w kierunku uzyskania maksymalnej wydajności biosyntezy zewnątrzkomórkowych proteaz koagulujących białka mleka o właściwościach zbliżonych do naturalnej podpuszczki cielęcej. Równolegle badałem możliwość wykorzystania lipaz, proteaz i β -galaktozydazy towarzyszących syntezie enzymów koagulujących do przyspieszenia procesu dojrzewania serów. Otrzymałem preparat enzymów koagulujących charakteryzujący się korzystniejszym stosunkiem aktywności koagulującej do proteolitycznej w porównaniu z handlowym preparatem Marzyme oraz Suparen i porównywalnym z preparatem Fromase i Rennilase. Zastosowanie otrzymanego preparatu do koagulacji białek mleka w procesie produkcji sera camembert w zakładzie mleczarskim w Gnieźnie pozwoliło uzyskać produkt o wysoce pożądanym cechach sensorycznych. Preparat enzymów wewnątrzkomórkowych (proteazy, lipazy, β -galaktozydaza) może być przydatny do przyspieszenia dojrzewania niektórych gatunków serów - doświadczenia prowadzono z serem camembert i serem smażonym (wyniki badań zostały zamieszczone w pracy dyplomowej na stopień doktora

w roku 1997 i publikacjach IID-10, IID-21, IID-27, IID-38).

W latach 1993 - 1997 uczestniczyłem w pracach dotyczących badania właściwości technologicznych nowej generacji enzymów koagulujących (Chymax, Chymogen and Maxiren) uzyskiwanych przy użyciu genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów (GMO). Preparaty zastosowano do produkcji różnych gatunków serów w wybranych zakładach mleczarskich (publikacje IIA-9, IIA-10, IID-17, IID-41)

5.2 Obniżenie zawartości soli w produktach mleczarskich

W latach 1987 -1995 uczestniczyłem w pracach dotyczących zwiększenia zawartości potasu w serach dojrzewających i jednocześnie zmniejszeniu zawartości sodu, które były kontynuacją mojej pracy magisterskiej prowadzonej pod kierunkiem Prof. A. Repsa. Stosunek sodu do potasu w diecie ma ogromny wpływ na zdrowie człowieka. Mleko jest bogatym źródłem potasu. Jednak w procesie produkcji serów dojrzewających ponad 95% potasu przechodzi do serwatki. Stwierdzono możliwość zwiększania zawartości potasu w serach dojrzewających poprzez zastosowanie do solenia serów solanki zawierającej mieszaninę chlorku sodu i chlorku potasu. Zwiększony poziom potasu w serach nie wpływał negatywnie na ich proces dojrzewania. Jakość niektórych gatunków serów nawet o kilkakrotnie wyższej zawartości potasu była porównywalna do serów kontrolnych (publikacje IIA-11, IIA-12, IID-31, IID-34, IID-40).

5.3 Zastosowanie wysokich ciśnień w przemyśle mleczarskim

W 1993 roku odbyłem trzymiesięczny staż naukowy w Uniwersytecie Lincolna w Humberside w Wielkiej Brytanii, a następnie w 1995 roku dwumiesięczny w Uniwersytecie w Gandawie w Belgii z zakresu nowoczesnych metod przetwarzania żywności, które wpłynęły na zmianę moich zainteresowań w kierunku zastosowania wysokich ciśnień w biotechnologii mleczarskiej (publikacje przeglądowe IID-36, IID-37). Realizacja zainteresowań była możliwa dzięki podjęciu współpracy w roku 1994 z zespołem Prof. S. Porowskiego z Instytutu Wysokich Ciśnień w Warszawie, który dysponował urządzeniami do generacji wysokich ciśnień. W ramach grantu KBN (1995 - 1997) jako wykonawca projektu badałem wpływ wysokich ciśnień na mikroorganizmy i enzymy serów dojrzewających oraz jakość mikrobiologiczną i wybrane właściwości fizykochemiczne mleka (publikacje IIA-7, IID-15, IID-20, IID-22, IID-23, IID-24, IID-25, IID-26, IID-28, IID-29, IID-32, IID-33). Za największe osiągnięcie uważam odkrycie możliwości znaczącego przyspieszenia dojrzewania serów poddanych ciśnieniu rzędu 50 MPa (ser camembert) oraz utrwalania mleka z użyciem ciśnień z zachowaniem wysokiej

aktywności rodzimych enzymów mleka. Jakość mikrobiologiczna mleka surowego poddanego działaniu ciśnienia powyżej 600 MPa była porównywalna do jakości mikrobiologicznej mleka poddanego pasteryzacji w temperaturze 72°C przez 15 sekund. Retencja białka w skrzepie uzyskanym w wyniku kwasowej lub enzymatycznej koagulacji mleka poddanego presuryzacji zwiększała się wraz ze wzrostem stosowanego ciśnienia. W latach 1998 - 1999 tematykę wysokich ciśnień kontynuowałem u Prof. J-C. Cheftela w Uniwersytecie Montpellier II w Montpellier we Francji w laboratorium Biochemii i Technologii Spożywczej w ramach stażu podoktorskiego przyznanego przez Francuskie Ministerstwo Szkolnictwa Wyższego. Badałem efekt wysokich ciśnień w niskich temperaturach do -16°C na białka mleka (β -laktoglobulinę) i mikroorganizmy. Zmiany strukturalne białek były monitorowane metodami: kolorymetrii skaningowej (DSC), chromatografii cieczowej (FPLC) i analizy czwartorzędowej pochodnej widma spektrofotometrycznego (UV). Uzyskane rezultaty wykazały, że presuryzacja białek w niskich temperaturach w niewielkim stopniu wpływa na ich strukturalne zmiany i utratę właściwości funkcjonalnych. Ponieważ zastosowanie wysokich ciśnień w niskich temperaturach jest skuteczną metodą inaktywacji drobnoustrojów, może ona znaleźć praktyczne zastosowanie do przemysłowego wyjaławiania roztworów białek. Za najważniejsze osiągnięcia naukowe wynikające z prowadzonych tam badań uważam, odkrycie zjawiska odwracalnej denaturacji białek poddanych działaniu wysokich ciśnień po powrocie do ciśnienia atmosferycznego (wyniki badań opublikowano w Food Hydrocolloids w 2001 r, IIA-8). Odkrycie tego zjawiska rozszerza zastosowanie wysokich ciśnień poza obszar biotechnologii żywności i może mieć znaczenie między innymi w opracowaniu metod przechowywania np. organów ludzkich stosowanych do przeszczepów.

5.4 Doskonalenie technologii produkcji bakterii fermentacji mlekowej

W kwietniu 1999 roku rozpocząłem pracę w biotechnologicznej firmie polsko-francuskiej Rhodia Food Biolacta w Olsztynie zajmującej się produkcją i dystrybucją dodatków do żywności na stanowisku kierownika wydziału badań i rozwoju firmy (siedmioosobowy zespół). W roku 1998 firma uruchomiła nową linię do produkcji ziarna kefirowego i produkcji bakterii fermentacji mlekowej w formie liofilizowanej. Badania zespołu skierowane były na modernizację i opracowanie nowych kultur mleczarskich głównie w celu rozwoju rynku kefiru i twarogów w oparciu o izolację i selekcję nowych szczepów, ale również wykorzystanie istniejącej kolekcji szczepów firmy Rhodia Food. Ważnym elementem była również adaptacja produkcji do nowej linii i doskonalenie procesu produkcji kultur oraz

rozwiązywanie bieżących problemów produkcyjnych. W ramach zakresu obowiązków byłem odpowiedzialny za współpracę z innymi ośrodkami badawczymi firmy Rhodia Food i zewnętrznymi jednostkami naukowymi i badawczo-rozwojowymi w kraju. Do najważniejszych osiągnięć z tego okresu w procesie produkcji kultur zaliczam wprowadzenie zmodyfikowanego podłoża do hodowli mezofilnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej i krioprotektora o wysokiej koncentracji suchej masy stosowanego w liofilizacji szczepów (raporty wewnętrzne firmy). Ważnym elementem była również modyfikacja procesu produkcji ziarna kefirowego pozwalająca uzyskać liofilizowany produkt skracający o kilka godzin proces produkcji kefiru w zakładzie mleczarskim. Modyfikacja ta miała wpływ na renesans produkcji kefiru i przekładała się na korzyści ekonomiczne dla krajowej biotechnologii.

5.5 Poszukiwanie szczepów bakterii fermentacji mlekowej do biosyntezy funkcjonalnych egzopolisacharydów (EPS)

W latach 1999 - 2001 jako partner projektu EU-INCO Copernicus IC15-CT98-0905 dotyczącego kontrolowanej produkcji funkcjonalnych egzopolisacharydów (EPS) przez termofilne bakterie mlekowe prowadziłem poszukiwania szczepów produkujących egzopolisacharydy, izolację egzopolisacharydów oraz ich charakterystykę (kompozycja cukrów, ciężar cząsteczkowy, właściwości reologiczne). Za największe osiągnięcia prowadzonych badań uważam utworzenie kolekcji 15 szczepów z rodzaju *Streptococcus* i *Lactobacillus* produkujących EPS wyizolowanych głównie z naturalnie ukwaszonych produktów mleczarskich pozyskiwanych z krajów Europy i Azji. W wyniku kontynuacji badań już po zakończeniu projektu uzyskano szczep z gatunku *Streptococcus thermophilus*, który produkował w mleku EPS o wysoce pożądanym cechach tekstury w przemyśle mleczarskim (krótka struktura fermentowanego mleka przy jednocześnie wysokiej lepkości) a jednocześnie charakteryzował się odmiennym powinowactwem fagowym od dotychczas posiadanych w portfolio firmy Rhodia Food szczepów. Szczep ten od 2004 roku stosowany jest powszechnie w składzie wielu kultur produkowanych w skali przemysłowej. Część prac projektowych dotycząca głównie charakterystyki EPS została wykonana w ścisłej współpracy z zespołem Prof. A. Babuchowskiego z UWM w Olsztynie i zespołem Prof. L. De Vuysta z Vrije Universiteit Brussel z Belgii. Z uwagi na wartość komercyjną projektu wyniki badań były upublicznione w niewielkim zakresie. Zachęteni wynikami uzyskanymi dla szczepów termofilnych w latach kolejnych w ramach badań własnych rozpoczęto poszukiwanie mezofilnych szczepów z rodzaju *Lactococcus* charakteryzujących się uzdolnieniami do

produkcji EPS, a występujących znacznie rzadziej w przyrodzie. Za największe osiągnięcie z tego zakresu uważam znalezienie kilku szczepów wszystkie z gatunku *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, które pozwalały w wyniku fermentacji w mleku uzyskać produkt o podwyższonej lepkości i krótkiej strukturze. Szczepy te znalazły zastosowanie w konstrukcji kultur do produkcji kefiru o podwyższonej lepkości. Próba wykorzystania mezofilnych bakterii kwasu mlekowego produkujących EPS kontynuowana jest w produkcji twarogu z podgęszczonego mleka we współpracy z zespołem Prof. J. Szpendowskiego z Katedry Mleczarstwa i Zarządzania Jakością. Badania te prowadzone są ze środków KBN przyznanych na lata 2010 - 2013 w ramach projektu dotyczącego opracowania bezodpadowej technologii serów twarogowych otrzymywanych ze wszystkich białek mleka (publikacje IIA-1, IID-2).

5.6 Oznaczanie obecności, izolacja, identyfikacja i charakterystyka właściwości bakteriofagów bakterii kwasu mlekowego wirulentnych wobec kultur startowych stosowanych w przemyśle mleczarskim

Od 1999 roku w strukturach wydziału badań i rozwoju w Olsztynie funkcjonuje podległe mi laboratorium fagowe zajmujące się monitorowaniem zaburzeń fermentacyjnych skoncentrowane głównie na wykrywanie bakteriofagów wobec stosowanych kultur i sugerowaniem właściwej rotacji kultur w polskim przemyśle mleczarskim. W okresie od 1999 do roku 2005 laboratorium zwiększa swój zakres działania na rynki wschodnie (Europy i Azji) a następnie szereg krajów Europy Zachodniej stając się drugim, co do wielkości laboratorium w Rhodia Food a następnie w Danisco, jej prawnym następcą. Oprócz działalności czysto usługowej w laboratorium prowadzone są badania dotyczące oporności fagowej szczepów bakterii fermentacji mlekowej i badania dotyczące selekcji najbardziej skutecznych dezynfektantów i sposobów dezynfekcji w celu zapewnienia bezpieczeństwa fagowego w zakładach mleczarskich. Za najważniejsze osiągnięcie naukowo-poznawcze uważam przeprowadzenie badań oceny skuteczności dezynfektantów aktualnie stosowanych w przemyśle mleczarskim wobec wyselekcjonowanych najbardziej zjadliwych fagów z kolekcji firmy Danisco. Celem badań było znalezienie minimalnej skutecznej koncentracji dezynfektantów w rekomendowanych przez producenta warunkach temperatury i czasu z uwzględnieniem czynników zakłócających (np. obecność serwatki). W oparciu o podpisaną współpracę z największymi dostawcami dezynfektantów i w oparciu o kwestionariusz przeprowadzony na całym świecie wśród sprzedawców i naukowców firmy Danisco pracujących dla przemysłu mleczarskiego wyselekcjonowano do

badan 33 dezynfektanty stosowane do dezynfekcji w systemie CIP jak również do dezynfekcji powierzchni, urządzeń, rąk i obuwia. Stwierdzono, że większość dezynfektantów w rekomendowanych optymalnych przez producentów koncentracjach jest nie skuteczna w obecności substancji interferujących w stosunku do większości wyselekcjonowanych ze środowiska mleczarskiego fagów. Na podstawie uzyskanych rezultatów opracowano przewodnik dla zespołów sprzedażowych i aplikacyjnych firmy Danisco pomagający dobrać skuteczny dezynfektant w danych warunkach. Zaskoczeniem było odkrycie znaczącej różnicy odporności fagów szczepów mezofilnych i termofilnych na te sam dezynfektant. Szczegółowe wyniki badań są przedmiotem wewnętrznego raportu (Phagicide 936 z listopada 2010, IIE-1).

W laboratorium fagowym zostały wykonane pod moim kierunkiem dwie prace magisterskie M. Strużyńskiej „Wpływ wybranych czynników fizyko-chemicznych na przeżywalność bakteriofagów wirulentnych wobec bakterii z rodzaju *Lactococcus*” (2007) i D. Kierznikiewicz „Optymalizacja metod i warunków oznaczania populacji bakteriofagów wirulentnych wobec *Lactococcus*” (2008).

W latach 2002 - 2005 jako wykonawca projektu dotyczącego izolacji i charakterystyki molekularnej występujących na terenie Polski bakteriofagów wirulentnych dla bakterii z rodzaju *Lactococcus* w procesach biotechnologicznych poszukiwałem najbardziej zjadliwych i pochodzących z nietypowych zaburzeń procesów fermentacji serwatek na podstawie rozszerzonych analiz fagowych z uwzględnieniem namnożenia faga i określenia jego miana. Badania dotyczące tematyki fagów bakterii kwasu mlekowego od 2001 roku prowadziłem w ścisłej współpracy z zespołem Prof. J. Bardowskiego z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Wynikiem współpracy z tego obszaru jest publikacja w Acta Biochemica Polonica z roku 2007 (IIA-6) i obszerna monografia w książce o bakteriach mlekowych pt. "Bacteriophage resistance and prevention of phage contamination during dairy food production" z roku 2012 (IID-3).

W 2007r po odkryciu naturalnego mechanizmu obrony bakterii kwasu mlekowego przed infekcjami fagowymi CRISPR/Cas, w Danisco zastosowano ten mechanizm do produkcji szczepów *Streptococcus thermophilus* produkujących egzopolisacharydy charakteryzujących się identycznymi właściwościami technologicznymi, ale o zróżnicowanej oporności fagowej. W ramach realizowanego projektu prowadziliśmy badania oporności fagowej nowych wariantów szczepów. Mechanizm CRISPR/Cas i proces sterowanego nabywania oporności fagowej u bakterii mlekowych opisałem wspólnie z doktorantem M. Plechem z Instytutu Nauk o Środowisku, Uniwersytetu Jagiellońskiego w formie pracy monograficznej

opublikowanej w Przemysle Spozywczym w 2012 r (IID-5).

5.7 Zastosowanie fermentacji mlekowej do obnizenia alergenosci bialek mleka

W latach 2002 – 2005 jako partner projektu QLK1-CT-2001-01239 w V Programie Ramowym uczestniczyłem w badaniach w zakresie dotyczącym wpływu procesu fermentacji mlekowej na obniżenie alergiczności białek mleka. W oparciu o wspólne badania przeprowadzone na dzieciach pacjentach Children's Hospital w Atenach cierpiących na alergię na krowie mleko stwierdzono, że fermentacja mleka w szczególności ziarnem kefirowym prowadzi do istotnej redukcji alergiczności (9th International Symposium of Immunological, Chemical and Clinical Problems of Food Allergy, April 18th-21st, Budapest, Hungary, 2004, poster). Rezultaty są wynikiem testu skórniego i wymagają potwierdzenia w badaniach pokarmowych.

W latach 2006 - 2009 jako wykonawca w projekcie dotyczącym zastosowania sieciującego preparatu enzymatycznego w celu obniżenia alergennych właściwości białek mleka prowadziliśmy badania w kierunku pozyskania produktów mleczarskich jogurtu i kefiru z udziałem transglutaminazy realizowanym z zespołem Prof. B. Wróblewskiej z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie. Prowadziliśmy badania w kierunku selekcji kultur i optymalizacji dodatku transglutaminazy na reologię, mikrobiologię, dynamikę ukwaszania i wybrane wyróżniki jakości produktów mleczarskich. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano wysokiej jakości kefir i jogurt o podwyższonej lepkości i o obniżonej alergiczności. Wyniki badań opublikowano między innymi w Food Hydrocolloids (IIA-5), World Journal of Microbiology and Biotechnology (IIA-4) i International Journal of Food Science and Technology (IIA-2).

5.8 Charakterystyka mikroflory, produkowanych w Polsce, serów dojrzewających

Mikroflora serów dojrzewających jest krytycznym czynnikiem, który może powodować zróżnicowanie ich jakości i wady. Badano mikroflorę serów dojrzewających typu holenderskiego, szwajcarskiego i szwajcarsko-holenderskiego produkowanych w Polsce. W serach oznaczano ogólną ilość bakterii mlekowych (LAB), bakterie mlekowe fermentujące cytryniany, bakterie mlekowe odporne na wankomycynę, bakterie mlekowe odporne na wankomycynę i fermentujące cytryniany, ogólną ilość bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i drożdże. Niestartowe bakterie mlekowe (NSLAB) i drożdże stanowiły dominującą mikroflorę serów produkowanych w Polsce. Nie stwierdzono wzajemnych zależności

między ilością drożdży a populacją NSLAB w badanych serach. Populacja NSLAB i drożdży była zróżnicowana wśród zakładów produkujących ten sam rodzaj sera. Największe zróżnicowanie zaobserwowano w populacji niestartowych bakterii mlekowych opornych na wankomycynę i jednocześnie fermentujących cytryniany, które wahało się od nie wykrywalnej ilości do populacji powyżej 8 logarytmicznych rzędów w gramie sera. Uzyskane rezultaty wskazują na zróżnicowane źródła kontaminacji serów drożdżami i NSLAB w zakładach mleczarskich (publikacja IIA-3).

Badano również zmiany w populacji startowych i niestartowych bakterii mlekowych i drożdży w serze gouda w procesie jego dojrzewania prowadzonego w dwóch niezależnych dojrzewalniach. Stwierdzono, że miejsce dojrzewania nie miało wpływu na mikroflorę sera. W serze bezpośrednio po soleniu dominowały bakterie startowe i stanowiły 90% ogólnej populacji drobnoustrojów. W trakcie dojrzewania sera populacja bakterii startowych systematycznie malała. Natomiast populacja NSLAB i drożdży była bardzo nieliczna w serze po soleniu i wzrastała intensywnie w procesie jego dojrzewania. Większość NSLAB stanowiły homo- i heterofermentatywne gatunki *Lactobacillus* oporne na wankomycynę i zdolne do rozwoju w szerokim zakresie temperatur (publikacja IID-4).

5.9 Nowe kierunki wykorzystania bakterii probiotycznych

W latach 2003 – 2011 uczestniczyłem w projektach aplikacyjnych dotyczących nowych kierunków wykorzystania probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej. Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- opracowanie we współpracy z Działem Badawczo-Rozwojowym Cadbury Wedel technologii produkcji czekolady probiotycznej (raport IIE-2);
- opracowanie kompozycji suplementu diety w postaci kapsułek probiotycznych o długim terminie przydatności w temperaturze pokojowej (probiotyki, prebiotyki, nośnik) we współpracy z firmą United Pharma, która wprowadziła suplement do sprzedaży (handlowa nazwa LACTIV UP) od listopada 2005 roku poprzez sieć polskich aptek;
- zmniejszenie częstotliwości i ostrości biegunk u źrebiąt koni pełnej krwi angielskiej poprzez zastosowanie inaktywowanych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Propionibacterium* w diecie klaczy bezpośrednio przed wyżrebieniem i w trakcie okresu karmienia (praca po recenzji, w druku w Medycynie Weterynaryjnej). Badania prowadzone były we współpracy ze Stadniną Koni w Krasnem (publikacja IID-1);
- opracowanie kultury probiotycznej ChOOZIT Howaru BIO-C Immun+ do produkcji

termofilnych napojów mleczarskich o potwierdzonych właściwościach wzmacniających odporność immunologiczną u ludzi - kultura w sprzedaży od 2010 r;

- opracowanie receptury produkcji mlecznego produktu probiotycznego w oparciu o szczepy *Lactobacillus* w odpowiedzi na Actimel Danone – 2003.

W przyszłości zamierzam kontynuować obrane wcześniej kierunki badań, a w szczególności stabilności ekosystemu ziaren kefirowych i nowych aplikacji dla żywych i martwych bakterii mlekowych w obszarze biotechnologii spożywczej w tym głównie mleczarskiej oraz przemysłu produkcji pasz dla zwierząt. W ostatnim czasie moja uwaga koncentruje się na roli inaktywowanych bakterii mlekowych na organizm gospodarza.

Piotr Kołakowski