

AUTOREFERAT

DR INŻ. AGNIESZKA JANKOWSKA

OLSZTYN 2013

ŻYCIORYS NAUKOWY

W roku 1989 rozpoczęłam naukę w Liceum imienia KEN w Przasnyszu w klasie o profilu biologiczno-chemicznym. W roku 1993 podjęłam studia na wydziale Technologii Żywności w Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie. Studia ukończyłam z wynikiem bardzo dobrym w roku 1998, uzyskując tytuł magistra inżyniera w zakresie technologii żywności żywienia człowieka na podstawie pracy magisterskiej „Możliwości obniżenia zawartości chlorku sodu w serach topionych” wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Arnolda Reys w Katedrze Biotechnologii Żywności ART. w Olsztynie. W czasie studiów dwukrotnie wyjeżdżałam na praktyki studenckie do Wielkiej Brytanii.

W roku 1998 zostałam przyjęta na stacjonarne studia doktoranckie na wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczo-Technicznej w Katedrze Biotechnologii żywności pod opieką naukową prof. dr hab. Arnolda Reys. Moja praca badawcza dotyczyła wpływu wysokich ciśnień na drobnoustroje. W czasie studiów doktoranckich zostałam wyróżniona stypendium Olsztyńskiego Forum Naukowego za szczególne osiągnięcia badawcze i dorobek naukowy.

Stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia uzyskałam 7.11.2002 roku na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej nt. „Wpływ wysokiego ciśnienia na mikroflorę kefiru.” Praca decyzją Rady Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego została wyróżniona Nagrodą J.M. Rektora UWM.

Pracuję w zespole naukowym pod kierownictwem Prof. dr hab. Arnolda Reys.

Prace badawcze dotyczące wpływu wysokich ciśnień na drobnoustroje oraz możliwości zastosowania wysokich ciśnień do utrwalania żywności kontynuowałam podczas pracy zawodowej. Od 1.02.2004 roku zostałam zatrudniona w Katedrze Biotechnologii Żywności w charakterze technologa, a od 1.06.2007r. na etacie adiunkta.

Imię i nazwisko: AGNIESZKA JANKOWSKA

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca

Dyplom magistra inżyniera – kierunek Technologia żywności i żywienie człowieka, specjalność biotechnologia żywności, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, Wydział Technologii Żywności, 09. 06. 1998r.

Dyplom doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności, 07.11. 2002 r.

Dyplom ukończenia studiów podyplomowych „Żywienie Człowieka i Dietetyka” – Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 05.12.2011r.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

01. 06. 2007 – – Adiunkt w Katedrze Biotechnologii Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

01. 02. 2003 – 01. 06. 2007 – Technolog w Katedrze Biotechnologii Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

01. 10. 1998 – 30. 09. 2002 – Doktorantka w Katedrze Biotechnologii Żywności, j.w.

3. WSKAZANE OSIĄGNIĘCIA* WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ.595 ZE ZM.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Cykl jednotematycznych publikacji przedstawionych pod wspólnym tytułem:

„BADANIA MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA WYSOKIEGO CIŚNIENIA DO PRZEDŁUŻENIA TRWAŁOŚCI JOGURTU”.

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

** w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstawanie.*

- (1) **Jankowska A., Reps A., Proszek A., Krasowska M.** (2003) Applying of high pressure to yoghurt preservation. *Med. Fac. Landbouw. University Gent* 68/3b, p: 477-480. **MNiSW₂₀₁₂ - 5 pkt.**
- (2) **Jankowska A., Reps A., Proszek A., Krasowska M.** (2005) Effect of high pressure on microflora and sensorial characteristics of yoghurt. *Pol. J. Food Nutrition Sci.*, vol. 14/55 (1), p: 79-84. **MNiSW₂₀₁₂ - 8 pkt. WoS cyt - 3**
- (3) **Jankowska A., Wiśniewska K., Reps A.** (2005) Application of probiotic bacteria in production of yoghurt preserved by high pressure." *High Pressure Research*, 25 (1), p: 57-62. **IF₂₀₀₅ - 0,550 MNiSW₂₀₁₂ - 25 pkt. WoS cyt - 3**
- (4) **Jankowska A., Proszek A., Reps A., Wiśniewska K.** (2005) Antibacterial activity of microflora in the pressurized yoghurts. *Science and Technology of High Pressure*, Ed. E. Dinjus, N. Dahmen, Elsevier. ISBN 3-923704-49-6, p.: 1-8. **MNiSW₂₀₁₂ - 5 pkt.**
- (5) **Reps A., Jankowska A., Proszek A., Wiśniewska K.** (2007) Pressurized yoghurt as a carrier of probiotic bacteria. *Japan Science and Technology Information Aggregator Electronic Vol 1*. ISSN: 1882-1723. p.: 295-301. **MNiSW₂₀₁₂ - 5 pkt.**
- (6) **Jankowska A., Reps A., Proszek A., Wiśniewska K.** (2008) The effect of presurization and commercial starter cultures on selected properties of yoghurt. *Polish Journal of Natural Science*. Vol. 23, 2, p.: 482-495. **MNiSW₂₀₁₂ - 8 pkt. WoS cyt - 1**
- (7) **Reps A., Jankowska A., Wiśniewska K.** (2009) The effect of high pressure on selected properties of yoghurt. *High Pressure Research*, Vol. 21, 1, p.: 33-37., 25 (1), p: 57-62. **IF₂₀₀₉ - 0,850 MNiSW₂₀₁₂ - 25 pkt. WoS cyt - 1**
- (8) **Jankowska A., Wiśniewska K., Reps A., Grześkiewicz A.** (2009) Antibiotic resistance of pressurized strains of the *Lactobacillus* species. *High Pressure Research*, Vol. 29, 4, p.: 713-720. **IF₂₀₀₉ - 0,850 MNiSW₂₀₁₂ - 25 pkt.**
- (9) **Jankowska A., Grześkiewicz A., Wiśniewska K., Reps A.** (2010) Effect of pressurization on antibacterial properties of *Lactobacillus* strains. *High Pressure Research*, Vol. 30, 1, p.: 93-99. **IF₂₀₁₀ - 0,995 MNiSW₂₀₁₂ - 25 pkt.**
- (10) **Jankowska A., Grześkiewicz A., Wiśniewska K., Reps A.** (2012) Examining the possibilities of applying high pressure to preserve yoghurt supplemented with probiotic bacteria. *High Pressure Research* 32(3), p: 339-346. **IF₂₀₁₂ = 0,778 MNiSW₂₀₁₂ - 25 pkt.**

ŁĄCZNIE:

Impact factor według listy Journal Citation Reports (zgodnie z rokiem opublikowania)	- 4.023
Punkty MNiSW (punktacja zgodnie z rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 17. 09. 2012r.)	- 156
Liczba cytowań według Web of Science (na dzień 30.06.2013r.)	- 8

3.1. WPROWADZENIE

W ostatnich latach obserwuje się wśród konsumentów duże zainteresowanie żywnością świeżą, minimalnie przetworzoną. Nabywca coraz większą uwagę zwraca na ekologię przetwórstwa surowców, naturalność żywności, jej prozdrowotność, przy zachowaniu typowego smaku.

Dlatego też celem jaki stawiają sobie producenci jest zapewnienie trwałości oraz wysokiej wartości odżywczej żywności, przy zachowaniu korzystnych walorów organoleptycznych.

Przedłużanie trwałości surowców oraz produktów jest jednym z ważniejszych elementów produkcji żywności. Utrwalanie żywności ma na celu przedłużenie okresu przydatności do spożycia poprzez zabezpieczenie przed niekorzystnym oddziaływaniem czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych. Postęp w przedłużaniu trwałości żywności przejawia się nie tylko w udoskonalaniu metod tradycyjnych ale również w poszukiwaniu nowych, zwłaszcza niekonwencjonalnych, metod jej utrwalania.

Wpływ wysokiego ciśnienia na żywność po raz pierwszy opisał Bernard Hite w 1899 roku. Z przeprowadzonych wówczas badań wynikało, że mleko poddane działaniu ciśnienia 680 MPa (68000 Atm) w temperaturze pokojowej przez 10 minut, nie uległo ukwaszeniu w czasie 10 dni przechowywania, a mięso poddane działaniu ciśnienia 540 MPa nie wykazywało zmian mikrobiologicznych w czasie 3 tygodni przechowywania. Pomimo pomyślnych wyników, metoda utrwalania żywności poprzez stosowanie wysokich ciśnień nie upowszechniła się z uwagi na problemy techniczne związane z budową odpowiednich urządzeń.

Dopiero w latach 80-tych ubiegłego wieku wraz z rozwojem techniki wznowiono badania nad możliwością zastosowania wysokich ciśnień do utrwalania surowców i żywności.

Pierwszym krajem w którym produkty utrwalone metodą wysokich ciśnień wprowadzono na rynek była Japonia, gdzie w 1990 rozpoczęto produkcję dżemu utrwalonego poprzez działanie wysokiego ciśnienia. Rok później, również w Japonii, zainstalowano pierwszą automatyczną linię do produkcji soków cytrusowych utrwalonych metodą wysokich ciśnień.

W chwili obecnej w Japonii, Stanach Zjednoczonych oraz w wielu państwach Europy zachodniej produkowane są jogurty owocowe, galaretki, desery, dressingi oraz przetwory mięsne i rybne utrwalone z zastosowaniem technologii HPP (High Pressure Processing).

Produkty poddawane działaniu wysokiego ciśnienia nie zawierają środków konserwujących, a brak obróbki termicznej powoduje, że zachowują one wysoką wartość odżywczą przy znacznie przedłużonej trwałości. Należy nadmienić, że technologia wysokich ciśnień jest również bezpieczna z punktu widzenia ochrony środowiska.

Bakteriobójcze działanie wysokiego ciśnienia na drobnoustroje polega na zmianach w przepuszczalności ściany i błony komórkowej, co powoduje modyfikacje reakcji biochemicznych w komórce, oraz zmiany morfologiczne i uszkodzenia aparatu genetycznego.

Wpływ wysokiego ciśnienia na drobnoustroje, stanowiące istotny składnik żywności, jest przedmiotem wielu badań i opracowań naukowych. Znaczna liczba publikacji dotyczy oddziaływania wysokiego ciśnienia na mikroorganizmy patogenne, potencjalnie chorobotwórcze i szkodliwe, których eliminacja z żywności jest konieczna z punktu widzenia jej bezpieczeństwa.

Równie istotne są badania dotyczące wpływu wysokiego ciśnienia na mikroorganizmy będące naturalnym składnikiem żywności, tj. te które mają bezpośredni wpływ na wartość odżywczą oraz kształtują cechy organoleptyczne produktów. Jest to szczególnie istotne w odniesieniu do żywności fermentowanej.

Jogurt jest produktem otrzymanym w wyniku fermentacji mleka przez symbiotyczny układ bakterii fermentacji mlekowej: pałeczek *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* oraz ziarniaków *Streptococcus thermophilus*. Duża popularność jogurtu wśród konsumentów jest związana z wysokimi walorami smakowymi oraz odżywczymi tego napoju. Szczególnymi właściwościami prozdrowotnymi charakteryzują się jogurty zawierające dodatkowo specjalnie wyselekcjonowane szczepy o właściwościach probiotycznych. Najczęściej stosowane są szczepy bakterii probiotycznych należące do gatunków *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium*.

Korzystne oddziaływanie jogurtu na zdrowie człowieka jest związane między innymi z obecnością żywych komórek bakterii. Zgodnie z zaleceniami FAO/WHO liczba bakterii jogurtowych nie może być niższa niż 10^7 jtk/g produktu do końca okresu przydatności do spożycia (Codex Draft Standard, 2004). Jednak aktywność metaboliczna bakterii jogurtowych powoduje, że napój ten nie jest produktem trwałym.

Zwiększenie obszarów dystrybucji mlecznych napojów fermentowanych wynikające z tendencji do koncentracji produkcji, powoduje konieczność przedłużenia okresu ich trwałości do spożycia. Stosowanie metod termicznego utrwalania (termizacja, pasteryzacja, sterylizacja), zamrażania lub suszenia jakkolwiek przeciwdziała psuciu się produktu, powoduje pogorszenie właściwości organoleptycznych i redukcję liczby żywych bakterii, co znacznie obniża wartość odżywczą produktu, który, tym samym, nie może być uznany za jogurt.

Sprzedaż mlecznych napojów fermentowanych utrzymuje tendencję wzrostową od kilkunastu lat, co stwarza szerokie możliwości wprowadzania na rynek nowych, innowacyjnych i konkurencyjnych produktów.

Zastosowanie techniki wysokich ciśnień może stać się alternatywą lub uzupełnieniem tradycyjnych metod produkcji jogurtu, dlatego też celowe było podjęcie badań dotyczących wpływu wysokich ciśnień na bakterie stosowane w produkcji jogurtu i innych mlecznych napojów fermentowanych, w aspekcie przedłużenia ich trwałości.

3.2. CEL PRACY

Celem przedstawianego cyklu publikacji było:

- określenie możliwości zastosowania wysokich ciśnień do przedłużenia trwałości jogurtu,
- zbadanie wpływu wysokiego ciśnienia na bakterie stosowane do produkcji jogurtu i innych mlecznych napojów fermentowanych.

W badaniach stosowano jogurty otrzymane w warunkach laboratoryjnych przy użyciu handlowych szczepionek jogurtowych oraz jogurty wyprodukowane w Spółdzielni Mleczarskiej MLEKPOL w Grajewie, Zakład w Mrągowie.

Jogurt i stosowane w doświadczeniu bakterie fermentacji mlekowej, poddawano działaniu wysokiego ciśnienia w zakresie od 100-1000 MPa. Proces presuryzacji prowadzono w generatorze wysokiego ciśnienia w Katedrze Biotechnologii Żywności UWM w Olsztynie oraz w Instytucie Badań Wysokociśnieniowych PAN w Warszawie.

Zakres doświadczenia obejmował następujące badania:

- wpływu wysokiego ciśnienia na cechy organoleptyczne jogurtu,
- wpływu wysokiego ciśnienia na przeżywalność bakterii jogurtowych,
- wpływu wysokiego ciśnienia na kwasowość jogurtu oraz aktywność kwaszącą bakterii stosowanych do produkcji jogurtu,
- wpływu presuryzacji na aktywność antybakteryjną bakterii stosowanych do produkcji jogurtu.
- wpływu presuryzacji na antybiotykooporność bakterii stosowanych do produkcji jogurtu.
- zastosowania presuryzowanego jogurtu jako nośnika bakterii probiotycznych.

3.3. OMÓWIENIE NAJWAŻNIEJSZYCH REZULTATÓW BADAŃ

3.3.1. *Wpływ wysokiego ciśnienia na cechy organoleptyczne jogurtu.*

Wyniki badań przedstawiono w publikacjach (1), (2), (6), (7) i (8).

Nie stwierdzono wpływu ciśnienia 200 MPa na cechy organoleptyczne jogurtu naturalnego, natomiast ciśnienia w zakresie 400-1000 MPa miały wpływ na jego wygląd, konsystencję, smak i

zapach. Ciśnienie 400 MPa spowodowało pogorszenie konsystencji jogurtu, która stała się mniej sprężysta i elastyczna. W jogurcie stwierdzono większy opływ serwatki oraz bardziej zwarty i ściśliwy, ale niejednorodny („kłaczkowaty”) skrzep. Te zaobserwowane zmiany konsystencji jogurtu były najmniej zauważalne w jogurtach poddanych działaniu ciśnienia 550 i 600 MPa. Po presuryzacji w ciśnieniu 800 MPa konsystencja jogurtu stała się bardziej płynna - rzadsza. Natomiast po zastosowaniu ciśnienia 1000 MPa konsystencja jogurtu była zbliżona do konsystencji jogurtu niepoddanego działaniu ciśnienia. Jednocześnie smak i zapach jogurtów po zastosowaniu ciśnień powyżej 600 MPa określano jako „pusty” i mało typowy dla jogurtu. Nie stwierdzono zmiany barwy jogurtu po presuryzacji.

W dalszych badaniach określano możliwość utrwalenia jogurtu owocowego, stosując ciśnienie 550 MPa/15 min. w temperaturze pokojowej. Stwierdzono, że jogurt owocowy poddany presuryzacji charakteryzował się jednolitą i bardziej gęstą konsystencją w porównaniu do jogurtu niepresuryzowanego. W trakcie przechowywania w temperaturze 4°C nie stwierdzono pogorszenia cech organoleptycznych jogurtu presuryzowanego. Jogurt presuryzowany, przechowywany w temperaturze 4°C przez 28 dni nie wykazywał niekorzystnych cech organoleptycznych. Natomiast jogurty przechowywane w temperaturze 20°C, a zwłaszcza jogurty niepresuryzowane, wykazywały znaczne pogorszeniem konsystencji oraz cech smakowo-zapachowych już po pierwszym tygodniu przechowywania.

Badano również wpływ wysokiego ciśnienia w zakresie 100-1000 MPa/15 min. w przedziale co 100 MPa w temperaturze pokojowej, na jakość jogurtów naturalnych otrzymanych przy użyciu handlowych szczepionek YC-X16, YC-X11 (Chr. Hansen), MYE 92, MYE 95 (Danisco Biolacta Sp. z o.o.) oraz CSK 501 (CSK Food Enrichment). Ciśnienia 100-300 MPa spowodowały niewielkie zmiany smaku i aromatu badanych jogurtów. Natomiast ciśnienia 400-1000 MPa spowodowały negatywne zmiany smaku, konsystencji i wyglądu jogurtów.

3.3.2. Wpływ wysokiego ciśnienia na przeżywalność bakterii jogurtowych.

Wyniki dotyczące określenia wpływu presuryzacji na przeżywalność bakterii jogurtowych przedstawiono w publikacjach (1), (2), (4), (6), (7), (8).

Ciśnienie 200 MPa spowodowało redukcję liczby *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* $1,95 \times 10^9$ jtk/cm³ do $6,50 \times 10^7$ jtk/cm³ oraz redukcję liczby *Streptococcus thermophilus* $1,98 \times 10^9$ jtk/cm³ do $5,50 \times 10^8$ jtk/cm³. W miarę wzrostu wartości stosowanego ciśnienia, stopień redukcji liczby bakterii jogurtowych był wyższy. Po presuryzacji jogurtu w 1000 MPa liczba *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* wynosiła $6,00 \times 10^1$ jtk/cm³, liczba *Streptococcus thermophilus* uległa redukcji do $9,85 \times 10^2$ jtk/cm³.

W dalszej części doświadczenia badano przeżywalność bakterii jogurtowych w środowisku o zróżnicowanej kwasowości. Jogurty o kwasowości 4,20; 4,40; i 4,60 pH poddawano działaniu

ciśnienia 400-600 MPa/15 min. w przedziale co 50 MPa w temperaturze pokojowej. Największą redukcję liczby bakterii jogurtowych stwierdzono w jogurcie o kwasowości 4,20 pH. Zastosowanie ciśnienia 600 MPa spowodowało redukcję liczby *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* z $1,60 \times 10^9$ jtk/cm³ do $4,00 \times 10^1$ jtk/cm³ oraz redukcję liczby *Streptococcus thermophilus* z $3,98 \times 10^{10}$ jtk/cm³ do $7,05 \times 10^3$ jtk/cm³. Liczba bakterii w jogurcie o kwasowości 4,60 pH zmniejszyła się odpowiednio dla *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* z $1,30 \times 10^8$ jtk/cm³ do $2,20 \times 10^3$ jtk/cm³ oraz *Streptococcus thermophilus* z $1,60 \times 10^9$ jtk/cm³ do $2,40 \times 10^3$ jtk/cm³.

Badano również przeżywalność bakterii w jogurcie z dodatkiem wsadu owocowego, poddanym działaniu ciśnienia 550 MPa/15 min. w temperaturze pokojowej, podczas przechowywania przez 4 tygodnie w temperaturze 4 i 20°C. W jogurcie przechowywanym w temperaturze 4°C liczba *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* uległa redukcji z $3,37 \times 10^4$ jtk/cm³ bezpośrednio po presuryzacji do $3,30 \times 10^4$ jtk/cm³ po czterech tygodniach przechowywania, natomiast liczba *Streptococcus thermophilus* uległa redukcji z poziomu $1,97 \times 10^4$ jtk/cm³ do $1,10 \times 10^3$ jtk/cm³ po czterech tygodniach przechowywania. Natomiast w presuryzowanym jogurcie przechowywanym w temperaturze 20°C stwierdzono wzrost liczby *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* z $4,71 \times 10^4$ jtk/cm³ bezpośrednio po presuryzacji do $8,33 \times 10^6$ jtk/cm³ po czterech tygodniach przechowywania i liczby *Streptococcus thermophilus* z poziomu $7,70 \times 10^4$ jtk/cm³ do $8,66 \times 10^7$ jtk/cm³.

Badano wpływ presuryzacji w zakresie ciśnień 200-400 MPa/15 min. w przedziale co 50 MPa w temperaturze pokojowej na przeżywalność *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* w jogurtach otrzymanych przy użyciu szczepionek MYE 92 i MYE 95 (Danisco Biolacta Food) (Publikacja (4)). Bezpośrednio po presuryzacji, w/w zakresie ciśnień, liczba *Streptococcus thermophilus* uległa nieznacznej redukcji i pozostawała na zbliżonym do próby kontrolnej poziomie tj. 10^9 jtk/g. W jogurcie przygotowanym przy użyciu szczepionki MYE 92, liczba *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* uległa redukcji o jeden rząd wielkości po zastosowaniu ciśnień 200 i 250 MPa, oraz o trzy rzędy wielkości, po presuryzacji w 300, 350 i 400 MPa. Natomiast w jogurcie przygotowanym przy użyciu szczepionki MYE 95 liczba *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* pozostała na tym samym poziomie w próbie kontrolnej, jak i po zastosowaniu ciśnienia 200 MPa, i ulegała redukcji o jeden, dwa, trzy i cztery rzędy wielkości po zastosowaniu ciśnień, odpowiednio: 250, 300, 350 i 400 MPa. W czwartym tygodniu przechowywania, liczba *Streptococcus thermophilus* w jogurtach presuryzowanych utrzymywała się na poziomie 10^9 jtk/g, natomiast liczba *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* w jogurtach poddanych działaniu ciśnień 300, 350 i 400 MPa obniżyła się do poziomu 10^5 jtk/g. W jogurtach poddanych działaniu ciśnień 200 i 250 MPa liczba *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* utrzymywała się na poziomie 10^7 - 10^9 jtk/g.

Badania wpływu wysokiego ciśnienia w zakresie 100-1000 MPa w przedziale co 100 MPa, w temperaturze pokojowej na przeżywalność bakterii jogurtowych *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* w jogurtach naturalnych otrzymanych przy użyciu szczepionek YC-X16, YC-X11 (Chr. Hansen), MYE 92, MYE 95 (Danisco Biolacta Sp. z o.o.) oraz CSK 501 (CSK Food Enrichment) przedstawiono w publikacji (7).

Ciśnienia w zakresie 100-400 MPa spowodowały nieznaczną, o ok. 1 rząd wielkości, redukcję liczby *Streptococcus thermophilus*. Wraz ze wzrostem ciśnienia obserwowano niższą przeżywalność bakterii jogurtowych. Po ciśnieniowaniu w 1000 MPa najwyższą przeżywalność *Streptococcus thermophilus* stwierdzono w jogurcie otrzymanym poprzez uaktywnienie szczepionki YC-X16, natomiast najniższą przeżywalność *Streptococcus thermophilus* stwierdzono w jogurcie otrzymanym przy użyciu szczepionki MYE 92.

Wyższą wrażliwość na działające ciśnienie wykazały pałeczki jogurtowe *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. W jogurcie otrzymanym przy użyciu szczepionki YC-X11 oraz w jogurcie otrzymanym przy użyciu szczepionki CSK 501, całkowitą redukcję liczby *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, stwierdzono już po zastosowaniu ciśnienia 300 MPa. Natomiast w jogurtach otrzymanych poprzez uaktywnienie szczepionek YC-X16, MYE 92 i MYE 95, całkowitą redukcję liczby *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* stwierdzono po zastosowaniu ciśnienia 400 MPa.

Dalsze badania nad wpływem wysokich ciśnień na przeżywalność bakterii dotyczyły jogurtu otrzymanego przy użyciu szczepionki YC-X16.

W doświadczeniu stosowano ciśnienia 200-700 MPa, w przedziale co 100 MPa/15 min. w temperaturze pokojowej. Jogurt po presuryzacji przechowywano w temperaturze 4 i 20°C. W jogurcie przed presuryzacją, liczba pałeczek jogurtowych *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* i paciorkowców *Streptococcus thermophilus* wynosiła odpowiednio: $1,72 \times 10^9$ jtk/g i $2,38 \times 10^9$ jtk/g. Ciśnienie 200 MPa spowodowało redukcję liczby pałeczek *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* do poziomu $1,40 \times 10^6$ jtk/g oraz nieznaczną redukcję liczby paciorkowców *Streptococcus thermophilus* do poziomu $2,00 \times 10^9$ jtk/g. Zbliżony poziom przeżywalności bakterii jogurtowych stwierdzono po zastosowaniu ciśnienia 300 MPa. Ciśnienie 400 MPa spowodowało redukcję liczby pałeczek *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* do poziomu $5,40 \times 10^3$ jtk/g oraz redukcję liczby paciorkowców *Streptococcus thermophilus* do poziomu $1,90 \times 10^9$ jtk/g. Liczba pałeczek *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, po zastosowaniu ciśnień 500, 600, 700 MPa wynosiła odpowiednio $5,00 \times 10^2$ jtk/g, $3,40 \times 10^2$ jtk/g, oraz $2,85 \times 10^2$ jtk/g. Natomiast liczba paciorkowców *Streptococcus thermophilus* po zastosowaniu ciśnienia 500 MPa wynosiła $1,14 \times 10^5$ jtk/g, a po zastosowaniu ciśnień 600 i 700 MPa uległa redukcji do poziomu $3,00 \times 10^2$ jtk/g i $3,30 \times 10^2$ jtk/g.

W publikacji (9) przedstawiono wyniki dotyczące wpływu ciśnień 30; 60; 90 i 300 MPa na przeżywalność szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*) stosowanych w przemysłowej produkcji mlecznych napojów fermentowanych, w tym również jogurtu. Szczepy z rodzaju *Lactobacillus* po uaktywnieniu presuryzowano stosując ciśnienia 30, 60, 90 i 300 MPa/min w temperaturze pokojowej. Przeprowadzone badania wykazywały, że szczepy z rodzaju *Lactobacillus* charakteryzowały się zróżnicowaną wrażliwością wobec stosowanego ciśnienia. Znaczącą redukcję liczby bakterii spowodowało ciśnienie 300 MPa. Przeżywalność szczepu *Lb. casei* 0902 po presuryzacji w ciśnieniach 30, 60 i 90 MPa wynosiła odpowiednio 94,16%, 79,56% i 74,64%. Dalszy wzrost ciśnienia do 300MPa spowodował redukcję liczby tego szczepu do 39,78% liczby początkowej.

Nie stwierdzono zmian liczby szczepów *Lb. casei* T14 i *Lb. casei* T81 pod wpływem ciśnienia 30, 60 i 90 MPa. Natomiast po zastosowaniu ciśnienia 300 MPa przeżywalność tych szczepów wynosiła odpowiednio 19,59% i 4,22%. Najniższą wrażliwość na działanie ciśnienia wśród szczepów *Lactobacillus casei*, wykazywał szczep *Lb. casei* 0901, przeżywalność tego szczepu po zastosowaniu ciśnienia 300 MPa wynosiła 47,46%.

Szczepy *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* były mniej odporne w badanych warunkach presuryzacji w porównaniu do szczepów *Lb. paracasei* i *Lb. casei*. Najbardziej wrażliwy na działanie ciśnienia był szczep *Lb. bulgaricus* 0852, przeżywalność tego szczepu po zastosowaniu ciśnienia 30 MPa wynosiła 5,63%, a po zastosowaniu ciśnienia 60, 90 i 300 MPa odpowiednio 6,76%, 3,10% i 0,12%. Najmniej wrażliwy na działanie ciśnienia był szczep *Lb. bulgaricus* T60. Przeżywalność *Lb. bulgaricus* T60 po zastosowaniu ciśnienia 60 MPa wynosiła 92,63%, ciśnienie 90 MPa spowodowało redukcję do 78,95%, a ciśnienie 300 MPa do 69,47% początkowej liczby bakterii.

Wyższą odpornością na zastosowane ciśnienia charakteryzowały się pałeczki należące do gatunku *Lactobacillus acidophilus*. Wśród których najbardziej odporny na działanie wysokich ciśnień był szczep *Lactobacillus acidophilus* T294, którego liczebność po zastosowaniu ciśnienia 300 MPa obniżyła się do 98,04% liczby początkowej. Wśród szczepów należących do gatunku *Lactobacillus acidophilus* najniższą przeżywalnością charakteryzowały się szczepy *Lactobacillus acidophilus* ATTC 4356 i *Lactobacillus acidophilus* Bauer L0938, których liczebność po działaniu ciśnienia 300 MPa obniżyła się odpowiedni do 12,69% i 19,02% liczby początkowej.

3.3.3. Wpływ wysokiego ciśnienia na kwasowość jogurtu oraz aktywność kwaszącą bakterii stosowanych do produkcji jogurtu

Aktywność metaboliczna bakterii, których obecność jest niezbędna do otrzymania właściwych cech organoleptycznych produktu, powoduje niestety wzrost jego kwasowości i

pogorszenie jakości w czasie przechowywania. Wpływ wysokiego ciśnienia na kwasowość jogurtu oraz aktywność kwaszącą bakterii jogurtowych przedstawiono w publikacjach (1), (2), (6), (7), (8).

Badano wpływ ciśnień w zakresie 200-1000 MPa/15 min. w przedziale co 200 MPa w temperaturze pokojowej na kwasowość jogurtu. Stwierdzono nieznaczny spadek kwasowości czynnej jogurtu bezpośrednio po presuryzacji. Kwasowość czynna jogurtu przed presuryzacją wynosiła 4,24 pH, natomiast po zastosowaniu ciśnienia 600 MPa – 4,29 pH.

W dalszej części doświadczenia (publikacja (2)) badano wpływ presuryzacji na kwasowość jogurtu z dodatkiem wsadu owocowego, poddanego działaniu ciśnienia 550 MPa/15 min. w temperaturze pokojowej, podczas czterech tygodni przechowywania w temperaturze 4 i 20°C. Kwasowość czynna jogurtu niepresuryzowanego przechowywanego w temperaturze 4°C wzrosła z 4,37 pH bezpośrednio po przygotowaniu do 4,16 pH po 4 tygodniach przechowywania, kwasowość miareczkowa bezpośrednio po przygotowaniu wynosiła 37°SH, a po czterech tygodniach przechowywania wzrosła do 53°SH. Natomiast kwasowość czynna jogurtu niepresuryzowanego przechowywanego w temperaturze 20°C wzrosła z 4,54 pH bezpośrednio po przygotowaniu do 3,86 pH po 4 tygodniach przechowywania, kwasowość miareczkowa bezpośrednio po przygotowaniu wynosiła 40°SH, a po czterech tygodniach przechowywania wzrosła do 53°SH.

Badania dotyczące wpływu wysokiego ciśnienia w zakresie 100-1000 MPa w przedziale co 100 MPa, w temperaturze pokojowej na kwasowość jogurtów naturalnych otrzymanych poprzez zastosowanie następujących szczepionek YC-X16, YC-X11 (Chr. Hansen), MYE 92, MYE 95 (Danisco Biolacta Sp. z o.o.) oraz CSK 501 (CSK Food Enrichment) przedstawiono w publikacji (6). Kwasowość czynna badanych jogurtów wahała się od 4,305 pH w jogurcie przygotowanym przy użyciu szczepionki YC-X16 do 4,550 pH w jogurcie przygotowanym przy użyciu szczepionki MYE 95. Presuryzacja spowodowała nieznaczne obniżenie kwasowości czynnej jogurtu; od 0,025 jednostki pH w jogurcie otrzymanym przy użyciu szczepionki MYE 92 do 0,080 jednostki pH w jogurcie otrzymanym przy użyciu szczepionki YC-X16.

Kontynuując badania wpływu wysokich ciśnień na jogurt otrzymany przy użyciu szczepionki YC-X16 stosowano ciśnienia 200-700 MPa, w przedziale co 100 MPa/15 min. w temperaturze pokojowej. Jogurtu po presuryzacji przechowywano w temperaturze 4 i 20°C. Kwasowość czynna jogurtu niepresuryzowanego wynosiła 4,37 pH, natomiast kwasowość miareczkowa 41,5°SH. Bezpośrednio po presuryzacji, podobnie jak w poprzednio prowadzonych badaniach zaobserwowano niewielki spadek kwasowości czynnej jogurtu. W czasie przechowywania stwierdzono wzrost kwasowości czynnej w jogurtach niepresuryzowanych o 0,20 jednostki pH i 7,5°SH w temperaturze 4°C oraz o 0,38 jednostki pH i 12,5°SH w jogurcie przechowywanym w temperaturze 20°C. Kwasowość jogurtów poddanych działaniu ciśnień 300-700 MPa pozostała, niezależnie od temperatury przechowywania, na stałym poziomie.

W publikacji (9) przedstawiono wpływ ciśnień 30; 60; 90 i 300 MPa na aktywność kwaszącą szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*) stosowanych do produkcji mlecznych napojów fermentowanych, w tym również jogurtu. W doświadczeniu materiałem badawczym były 22 szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, które uaktywniano na podłożu płynnym MRS (37°C/24godz.) a następnie presuryzowano w 30; 60; 90 i 300 MPa przez 1min. w temperaturze 18°C. Spośród badanych szczepów największą aktywność kwaszącą wykazały szczepy *Lb. casei* T75 oraz *Lb. casei* T76. Natomiast szczepy *Lb. casei* T14 oraz *Lb. casei* 0903 wykazywały niewielki wzrost aktywności kwaszącej po działaniu ciśnienia 30 i 60 MPa, a w wyniku presuryzacji w 300MPa nastąpił spadek aktywności kwaszącej badanych szczepów. Wraz ze wzrostem stosowanego ciśnienia obserwowano spadek aktywności kwaszącej szczepów *Lb. casei* T51, *Lb. casei* T75, *Lb. casei* T76, *Lb. casei* T81 oraz *Lb. casei* 0902. Największy spadek aktywności kwaszącej stwierdzono dla szczepu *Lb. casei* T81. Ciśnienie 30 MPa spowodowało nieznaczny wzrost aktywności kwaszącej szczepów *Lb. paracasei* 0918, *Lb. paracasei* 0921 i *Lb. bulgaricus* T60. Stwierdzono również wzrost aktywności kwaszącej szczepu *Lb. bulgaricus* T151 poddanego działaniu ciśnień 30 i 60 MPa oraz szczepu *Lb. bulgaricus* T13 poddanego działaniu ciśnienia 60 i 90 MPa. Wraz ze wzrostem stosowanego ciśnienia stwierdzono osłabienie aktywności kwaszącej szczepów *Lb. casei* 0901, *Lb. bulgaricus* Ł 0851, *Lb. bulgaricus* Ł 0852.

Najbardziej opornym na działanie ciśnienia 300 MPa był szczep *Lb. bulgaricus* T60. Przyrost kwasowości w 24-godzinnej hodowli na mleku, szczepu niepoddanego działaniu ciśnienia wynosił 3,16 jednostki pH a w hodowli tego szczepu presuryzowanego w 300 MPa, przyrost kwasowości wynosił 3,10 jednostek pH. Wśród szczepów *Lactobacillus acidophilus* największe obniżenie aktywności kwaszącej zaobserwowano dla szczepu *Lactobacillus acidophilus* ATTC4356. Najbardziej odporny na działanie wysokiego ciśnienia okazał się szczep *Lactobacillus acidophilus* T123.

3.3.4. Wpływ presuryzacji na aktywność antybakteryjną bakterii stosowanych do produkcji jogurtu.

Zdolność biosyntezy substancji o działaniu antybakteryjnym m.in. kwasu mlekowego, octowego, nadtlenu wodoru, diacetylu, reuteryny, bakteriocyn oraz wielu innych jest cechą szczepową bakterii. Wpływ na aktywność antydrobnoustrojową mają również czynniki zewnętrzne: skład podłoża hodowlanego, uwodnienie, napowietrzenie, wiek hodowli, temperatura oraz czas inkubacji. Aktywność antybakteryjna ma wpływ na właściwości prozdrowotne mlecznych napojów fermentowanych. Korzystne oddziaływanie substancji antybakteryjnych, wytwarzanych przez drobnoustroje wchodzące w skład kultur starterowych stosowanych do ich produkcji ma wpływ na zachowanie równowagi bakteryjnej w przewodzie pokarmowym poprzez

eliminację mikroflory szkodliwej i patogennej. Dlatego też, określenie wpływu wysokich ciśnień na właściwości antybakteryjne było jednym z istotnych celów prezentowanego cyklu publikacji.

Jogurt otrzymany przy użyciu szczepionek MYE 92 i MYE 95 (Danisco Biolacta Sp. z o.o.) poddawano działaniu ciśnień w zakresie 200-400 MPa, w przedziale co 50 MPa/15 min w temperaturze pokojowej (publikacja (4)). Bezpośrednio po presuryzacji oraz po każdym z czterech tygodni przechowywania w temperaturze 4°C, oznaczano właściwości antybakteryjne wobec 9 szczepów testowych *Klebsiella* 449, *Klebsiella* 499, *Proteus* 16, *Proteus* J, *E. coli* 366, *E. coli* 323, *E. coli* 3, *Enterobacter* A₁, *Enterobacter* A₁/17. Jogurty niepresuryzowane, otrzymane z obu szczepionek, wykazywały działanie antybakteryjne wobec wszystkich stosowanych szczepów testowych bezpośrednio po przygotowaniu oraz przez cały okres przechowywania. Presuryzacja spowodowała osłabienie aktywności antybakteryjnej bakterii jogurtowych.

Badania dotyczące wpływu wysokiego ciśnienia w zakresie 100-1000 MPa w przedziale co 100 MPa, w temperaturze pokojowej na właściwości antybakteryjne jogurtów naturalnych otrzymanych poprzez zastosowanie następujących szczepionek YC-X16, YC-X11 (Chr. Hansen), MYE 92, MYE 95 (Danisco Biolacta Sp. z o.o.) oraz CSK 501 (CSK Food Enrichment) opisano w publikacji (7). Najsilniejsze właściwości antybakteryjne wykazywały jogurty otrzymane poprzez uaktywnienie szczepionek YC-X11, YC-X16, oraz MYE 95, które hamowały wzrost wszystkich 11 szczepów testowych stosowanych w doświadczeniu. Najsłabsze właściwości antybakteryjne oznaczono w jogurcie otrzymanym przy użyciu szczepionki CSK 501. Po zastosowaniu ciśnień 200-1000 MPa stwierdzono znaczne osłabienie antybakteryjnego działania jogurtów wraz ze wzrostem stosowanego ciśnienia. Po działaniu ciśnienia 1000 MPa jogurt otrzymany przy użyciu szczepionki YC-X11 wykazywał zahamowanie wzrostu sześciu szczepów testowych, jogurt otrzymany poprzez uaktywnienie szczepionki YC-X16 hamował wzrost pięciu szczepów testowych, a jogurty otrzymane poprzez zastosowanie szczepionek MYE 92, MYE 95 i CSK 501 hamowały wzrost trzech szczepów testowych.

Badano również wpływ ciśnień 30; 60; 90 i 300 MPa/1min./18°C na aktywność antybakteryjną 22 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) stosowanych do produkcji mlecznych napojów fermentowanych (publikacja (9)). W hodowlach niepresuryzowanych oraz presuryzowanych oznaczano aktywność antybakteryjną oraz zdolność syntetyzowania nadtlenku wodoru. Ciśnienia 30, 60 i 90 MPa nieznacznie hamowały aktywność antybakteryjną. Szczególnie wrażliwe na działanie ciśnienia były szczepy *Lb. bulgaricus* 0851 i *Lb. bulgaricus* T151. Szczep *Lb. bulgaricus* 0851 po presuryzacji w 300 MPa nie hamował wzrostu trzech a szczep *Lb. bulgaricus* T151 pięciu spośród dziewięciu stosowanych szczepów testowych.

Najmniej wrażliwy na działanie ciśnień był szczep *Lb. bulgaricus* T13. Nie stwierdzono zmniejszenia zdolności hamowania wzrostu szczepów testowych przez szczep *Lb. bulgaricus* T13 nawet po zastosowaniu ciśnienia 300 MPa. Wśród szczepów *Lactobacillus acidophilus* najsilniejszą aktywność antybakteryjną w próbach niepresuryzowanych, w stosunku do wszystkich szczepów testowych wykazywał szczep *Lactobacillus acidophilus* T294, zaś najslabszą *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938. Po presuryzacji w 300 MPa zaobserwowano zróżnicowane osłabienie hamowania wzrostu bakterii testowych.

Wśród badanych szczepów największą ilość nadtlenu wodoru, do 2 mg/l syntetyzowały szczepy *Lactobacillus acidophilus*. Jedynie szczep *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938 nie wykazywał zdolności wytwarzania nadtlenu wodoru. Należy jednak zauważyć, że presuryzacja wpłynęła na nieznaczne obniżenie syntezy nadtlenu wodoru przez w/w szczepy. Jedynie w przypadku *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 po presuryzacji w 90 i 300 MPa nastąpił wyraźny wzrost biosyntezy tego związku. Natomiast szczepy *Lactobacillus acidophilus* T 123 oraz *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 po zastosowaniu ciśnienia 300 MPa utraciły całkowicie zdolność wytwarzania nadtlenu wodoru. Wśród szczepów *Lactobacillus casei* jedynie szczep *Lb. casei* T14 charakteryzował się zdolnością do wytwarzania nadtlenu wodoru na poziomie 0,5 [mg/l] zarówno przed jak i po presuryzacji, niezależnie od wielkości stosowanego ciśnienia. Pozostałe szczepy nie wykazywały zdolności do wytwarzania nadtlenu wodoru. Interesujący jest fakt, że wśród szczepów *Lactobacillus bulgaricus* obecność nadtlenu wodoru w ilości 0-0,5 mg/l stwierdzono jedynie w hodowlach szczepu *Lb. bulgaricus* Ł 0851 poddanych uprzednio działaniu ciśnienia 60, 90 i 300 MPa i w hodowlach szczepu *Lb. bulgaricus* T13 presuryzowanego w 60 i 90 MPa – bakterie tego szczepu wytwarzały nadtlenek wodoru w ilości 2 mg/l.

3.3.5. Określenie wpływu presuryzacji na antybiotykooporność bakterii stosowanych do produkcji jogurtu.

W przypadku bakterii fermentacji mlekowej, które są często stosowane w czasie antybiotykoterapii, odporność na antybiotyki jest cechą pożądaną ponieważ umożliwia zasiedlanie przewodu pokarmowego człowieka podczas leczenia antybiotykami lub tuż po zakończeniu.

Celem doświadczenia opisanego w publikacji (8) było zbadanie wpływu ciśnień 30, 60, 90 i 300 MPa na antybiotykooporność szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) stosowanych do produkcji mlecznych napojów fermentowanych. Materiałem badawczym były 22 szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, które uaktywniano na podłożu płynnym MRS (37°C/24godz.) a następnie presuryzowano stosując ciśnienia 30, 60, 90 i 300 MPa/1min./18°C. Stwierdzono, że wszystkie badane szczepy były wrażliwe na antybiotyki stosowane w doświadczeniu. Dla większości badanych szczepów *Lactobacillus casei* wraz ze

wzrostem wartości stosowanego ciśnienia oporność na antybiotyki uległa osłabieniu. Największe obniżenie oporności nastąpiło po zastosowaniu ciśnienia 300MPa, szczególnie w przypadku szczepów *Lb. casei* T51, *Lb. casei* T75 oraz *Lb. casei* 0902. Stwierdzono natomiast niewielki wzrost antybiotykooporności szczepu *Lb. casei* T14 po działaniu ciśnień 30, 60 i 90MPa wobec większości antybiotyków. Największy wpływ presuryzacji na antybiotykooporność zanotowano dla szczepu *Lb. casei* T75 wobec tetracykliny, gdzie dla próby niepresuryzowanej strefa zahamowania wzrostu wynosiła 25 [mm], a po presuryzacji w 300MPa wzrosła do 46 [mm]. Większą wrażliwość na antybiotyki wykazywały szczepy *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Ciśnienia 30, 60 i 90 MPa nie wpływały lub powodowały jedynie niewielki wzrost wrażliwości badanych szczepów na antybiotyki. Podczas badań stwierdzono nieznaczny wzrost antybiotykooporności niektórych szczepów, na przykład szczepu *Lb. paracasei* 0921 wobec penicyliny, *Lb. casei* 0901 wobec ampicyliny i szczepu *Lb. bulgaricus* T60 również wobec ampicyliny. Strefy zahamowania wzrostu przed presuryzacją wynosiły odpowiednio 31mm, 32mm i 46mm. Natomiast po działaniu ciśnień 30, 60 i 90 MPa strefy zahamowania wzrostu były mniejsze o 2-5mm. Działanie ciśnienia 300 MPa powodowało znaczny wzrost wrażliwości na antybiotyki szczepów *Lb. bulgaricus* 0852, T151 i *Lb. casei* 0889. Pozostałe szczepy nie wykazywały większych różnic wielkości stref zahamowania wzrostu zarówno po działaniu ciśnień 30, 60, 90 jak i 300 MPa. Większość badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus* wykazywała wrażliwość na stosowane w doświadczeniu antybiotyki z wyjątkiem kanamycyny. Jedynie *Lactobacillus acidophilus* T123 oraz *Lactobacillus acidophilus* T294 były wrażliwe na ten antybiotyk. Zaobserwowano także, że szczepy *Lactobacillus acidophilus* Diat Ł0939, *Lactobacillus acidophilus* Bauer 0938 oraz *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 nie wykazywały wrażliwości na kanamycynę po presuryzacji 300 MPa.

Na podstawie uzyskanych wyników należy stwierdzić, że zastosowanie wysokich ciśnień miało wpływ na antybiotykooporność badanych bakterii. Po presuryzacji w 30 MPa i 60 MPa następował wzrost lub tylko nieznaczny spadek wrażliwości szczepów na antybiotyki. Wobec kilku szczepów presuryzacja nie miała żadnego wpływu na badaną cechę. Natomiast po zastosowaniu ciśnienia 90 MPa dla większości szczepów następował wzrost oporności na antybiotyki związany ze zmniejszeniem się stref inhibicji wzrostu. Presuryzacja w 300 MPa spowodowała bardzo wyraźny spadek oporności badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus* na antybiotyki. Analizując wielkość stref zahamowania wzrostu pałeczek mlekowych można również zaobserwować, że największą średnicę osiągały one w przypadku szczepów *Lactobacillus acidophilus* T123 oraz *Lactobacillus acidophilus* T29. Najbardziej oporny na działanie większości antybiotyków okazał się szczep *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938.

wzrostem wartości stosowanego ciśnienia oporność na antybiotyki uległa osłabieniu. Największe obniżenie oporności nastąpiło po zastosowaniu ciśnienia 300MPa, szczególnie w przypadku szczepów *Lb. casei* T51, *Lb. casei* T75 oraz *Lb. casei* 0902. Stwierdzono natomiast niewielki wzrost antybiotykooporności szczepu *Lb. casei* T14 po działaniu ciśnień 30, 60 i 90MPa wobec większości antybiotyków. Największy wpływ presuryzacji na antybiotykooporność zanotowano dla szczepu *Lb. casei* T75 wobec tetracykliny, gdzie dla próby niepresuryzowanej strefa zahamowania wzrostu wynosiła 25 [mm], a po presuryzacji w 300MPa wzrosła do 46 [mm]. Większą wrażliwość na antybiotyki wykazywały szczepy *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Ciśnienia 30, 60 i 90 MPa nie wpływały lub powodowały jedynie niewielki wzrost wrażliwości badanych szczepów na antybiotyki. Podczas badań stwierdzono nieznaczny wzrost antybiotykooporności niektórych szczepów, na przykład szczepu *Lb. paracasei* 0921 wobec penicyliny, *Lb. casei* 0901 wobec ampicyliny i szczepu *Lb. bulgaricus* T60 również wobec ampicyliny. Strefy zahamowania wzrostu przed presuryzacją wynosiły odpowiednio 31mm, 32mm i 46mm. Natomiast po działaniu ciśnień 30, 60 i 90 MPa strefy zahamowania wzrostu były mniejsze o 2-5mm. Działanie ciśnienia 300 MPa powodowało znaczny wzrost wrażliwości na antybiotyki szczepów *Lb. bulgaricus* 0852, T151 i *Lb. casei* 0889. Pozostałe szczepy nie wykazywały większych różnic wielkości stref zahamowania wzrostu zarówno po działaniu ciśnień 30, 60, 90 jak i 300 MPa. Większość badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus* wykazywała wrażliwość na stosowane w doświadczeniu antybiotyki z wyjątkiem kanamycyny. Jedynie *Lactobacillus acidophilus* T123 oraz *Lactobacillus acidophilus* T294 były wrażliwe na ten antybiotyk. Zaobserwowano także, że szczepy *Lactobacillus acidophilus* Diat Ł0939, *Lactobacillus acidophilus* Bauer 0938 oraz *Lactobacillus acidophilus* Nestle Ł0937 nie wykazywały wrażliwości na kanamycynę po presuryzacji 300 MPa.

Na podstawie uzyskanych wyników należy stwierdzić, że zastosowanie wysokich ciśnień miało wpływ na antybiotykooporność badanych bakterii. Po presuryzacji w 30 MPa i 60 MPa następował wzrost lub tylko nieznaczny spadek wrażliwości szczepów na antybiotyki. Wobec kilku szczepów presuryzacja nie miała żadnego wpływu na badaną cechę. Natomiast po zastosowaniu ciśnienia 90 MPa dla większości szczepów następował wzrost oporności na antybiotyki związany ze zmniejszeniem się stref inhibicji wzrostu. Presuryzacja w 300 MPa spowodowała bardzo wyraźny spadek oporności badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus* na antybiotyki. Analizując wielkość stref zahamowania wzrostu pałeczek mlekowych można również zaobserwować, że największą średnicę osiągały one w przypadku szczepów *Lactobacillus acidophilus* T123 oraz *Lactobacillus acidophilus* T29. Najbardziej oporny na działanie większości antybiotyków okazał się szczep *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938.

3.3.6. Badanie możliwości zastosowania presuryzowanego jogurtu jako nośnika bakterii probiotycznych.

Obecność szczepów bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* w jogurcie znacznie zwiększa jego wartość odżywczą, ale powoduje wiele problemów technologicznych. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ogranicza wzrost *Bifidobacterium* ze względu na wysokie zakwaszenie środowiska. Nadtlenek wodoru syntetyzowany przez *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ma hamujący wpływ na *Lactobacillus acidophilus*. Obecność *Streptococcus thermophilus* stymuluje wzrost ściśle beztlenowych szczepów *Bifidobacterium*. Dlatego jogurt, który zawiera tylko *Streptococcus thermophilus* może stanowić dobry nośnik probiotycznych szczepów *Bifidobacterium*. Bakterie probiotyczne również oddziaływają na siebie wzajemnie podczas wspólnej hodowli w czasie fermentacji, oraz podczas przechowywania jogurtu. W celu ograniczenia niekorzystnego wzajemnego oddziaływania bakterii jogurtowych *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* oraz probiotycznych szczepów *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* podczas wzajemnej inkubacji, jogurt naturalny utrwalono poprzez działanie wysokiego ciśnienia, a następnie stosowano dodatek bakterii probiotycznych. Przeprowadzone badania zostały opisane w publikacjach (3), (5) i (10).

W doświadczeniu, opisanym w publikacji (3), zastosowano ciśnienie 550 MPa/15 min. w temperaturze pokojowej. Do jogurtu stosowano dodatek pojedynczych oraz mieszanych kultur szczepów probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* w formie płynnej i liofilizowanej. Jogurt przechowywano w czasie 4 tygodni w temperaturze 4°C. Po każdym tygodniu przechowywania oznaczano liczbę bakterii jogurtowych i probiotycznych, kwasowość czynną (pH) i miareczkową (°SH), aktywność antybakteryjną oraz przeprowadzano ocenę organoleptyczną.

Ciśnienie 550 MPa spowodowało całkowitą redukcję liczby pałeczek jogurtowych *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, natomiast liczba paciorkowców *Streptococcus thermophilus* uległa redukcji z poziomu $8,65 \times 10^8$ jtk/cm³ przed presuryzacją, do $8,95 \times 10^6$ jtk/cm³. Podczas przechowywania liczba bakterii *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* utrzymywała się na zalecanym poziomie tj. nie mniej niż 10^6 jtk/cm³. Przeżywalność szczepów probiotycznych była wyższa w jogurtach z dodatkiem kultur probiotycznych szczepów *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium sp.* w formie płynnej, w porównaniu do jogurtów z dodatkiem kultur liofilizowanych.

Kwasowość czynna jogurtów z dodatkiem bakterii probiotycznych bezpośrednio po przygotowaniu wynosiła 4,37-4,41 pH. Podczas przechowywania nie stwierdzono znaczącego przyrostu kwasowości badanych jogurtów. Kwasowość miareczkowa utrzymywała się przez 4 tygodnie przechowywania na stabilnym poziomie w granicach 39-42°SH. Kwasowość jogurtu

wynosząca ok. 40°SH jest optymalna, ponieważ odpowiada najkorzystniejszemu fizjologicznie stężeniu kwasu mlekowego przy którym produkty te powinny być spożywane.

Jogurty presuryzowane, z dodatkiem bakterii probiotycznych wykazywały właściwości antybakteryjne w stosunku do wszystkich stosowanych w doświadczeniu szczepów testowych. Po każdym tygodniu przechowywania obserwowano stopniową redukcję aktywności antybakteryjnej. Największą aktywność antybakteryjną wobec stosowanych szczepów testowych stwierdzono w jogurcie z dodatkiem *Bifidobacterium*.

W publikacji (5) jogurt otrzymany przy użyciu szczepionki YC-X16 (Chr. Hansen) poddawano działaniu ciśnienia 550 MPa/15 min. w temperaturze pokojowej. Po presuryzacji stosowano dodatek uaktywnionej na mleku kultury probiotycznej BB12 (Chr. Hansen) zawierającej mieszaninę szczepów *Bifidobacterium*. Bezpośrednio po przygotowaniu oraz po każdym z czterech tygodni przechowywania w temperaturze 4 i 20°C oznaczano liczbę bakterii oraz kwasowość jogurtu. Po presuryzacji stwierdzono całkowitą redukcję pałeczek *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, oraz redukcję liczby paciorkowców *Streptococcus thermophilus* o jeden rząd wielkości. W presuryzowanym jogurcie liczba komórek *Bifidobacterium* bezpośrednio po przygotowaniu wynosiła $1,25 \times 10^5$ jtk/g. Po trzech tygodniach przechowywania w temperaturze 4°C liczba *Bifidobacterium* uległa redukcji do $9,10 \times 10^3$ jtk/g, a po czterech tygodniach przechowywania nie stwierdzono obecności *Bifidobacterium* w tym jogurcie. Natomiast w jogurcie przechowywanym w temperaturze 20°C nie stwierdzono obecności żywych komórek *Bifidobacterium* już w drugim tygodniu przechowywania. Liczba *Bifidobacterium* w jogurcie niepresuryzowanym bezpośrednio po przygotowaniu wynosiła $6,10 \times 10^6$ jtk/g, po dwóch tygodniach przechowywania w temperaturze 4°C liczba *Bifidobacterium* uległa redukcji do poziomu $4,50 \times 10^3$ jtk/g, a po trzech tygodniach przechowywania nie stwierdzono obecności *Bifidobacterium* w jogurcie. W jogurcie niepresuryzowanym przechowywanym w temperaturze 20°C, podobnie jak w jogurcie presuryzowanym, nie stwierdzono obecności *Bifidobacterium* w drugim tygodniu przechowywania.

Presuryzacja spowodowała nieznaczny spadek kwasowości czynnej jogurtu z poziomu 4,64 pH do 4,71 pH, po dodaniu hodowli *Bifidobacterium spp.* kwasowość czynna jogurtu wynosiła 4,81 pH. Kwasowość jogurtu niepresuryzowanego przechowywanego w temperaturze 4°C po czterech tygodniach wynosiła 4,52 pH, a kwasowość jogurtu niepresuryzowanego przechowywanego w temperaturze 20°C wynosiła 4,32 pH. Natomiast kwasowość jogurtów presuryzowanych przechowywanych w 4 i 20°C wynosiła odpowiednio 4,70 i 4,50 pH.

W publikacji (10) jogurt handlowy Milko naturalny wyprodukowany przez Spółdzielnię Mleczarską MLEKPOL w Mrągowie poddawano działaniu ciśnień 200 i 250 MPa przez 15 min w temperaturze 4°C i 18°C. Do jogurtu po presuryzacji dodawano w ilości 5% uaktywnione na mleku szczepionki zawierające probiotyczne szczepy *Lactobacillus acidophilus* (LA5) i *Bifidobacterium* sp. (BB12), a następnie przechowywano przez cztery tygodnie w temperaturze chłodniczej.

Stwierdzono, że poziom inaktywacji bakterii jogurtowych w większym stopniu zależał od temperatury presuryzacji niż od wysokości zastosowanego ciśnienia. Wyższą redukcję liczby bakterii uzyskano po presuryzacji w temperaturze 4°C.

W czasie przechowywania zaobserwowano niższą przeżywalność bakterii *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* oraz *Streptococcus thermophilus* w jogurtach presuryzowanych w porównaniu do przeżywalności tych bakterii w jogurtach niepresuryzowanych.

Zaobserwowano natomiast wyższą przeżywalność szczepów probiotycznych *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* w jogurcie presuryzowanym 200 MPa w 18°C w stosunku do jogurtu niepresuryzowanego.

Presuryzacja wpłynęła na obniżenie przyrostu kwasowości w presuryzowanych jogurtach w stosunku do jogurtów kontrolnych w kolejnych tygodniach przechowywania.

Podczas przechowywania, w jogurcie presuryzowanym 200 MPa/18°C/15 min. oraz w jogurcie kontrolnym, odnotowano osłabienie aktywności antybakteryjnej w stosunku do wszystkich szczepów testowych. Osłabienie wielkości stref zahamowania wzrostu szczepów testowych było istotne w stosunku do szczepów: *E. coli* DSM 682, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *K. pneumoniae* oraz *E. coli* ATCC 10536 ($\alpha = 0,05$). Pomimo różnic w aktywności antybakteryjnej, jakie zaobserwowano między pierwszym a czwartym tygodniem przechowywania, analiza statystyczna nie wykazała istotnych zmian pomiędzy aktywnością antybakteryjną jogurtów niepresuryzowanych i presuryzowanych w ostatnim tygodniu przechowywania.

Nie stwierdzono istotnych zmian cech organoleptycznych jogurtów po presuryzacji. Niemniej jednak oceniający zwrócili uwagę na mniej typowy dla jogurtu smak jogurtów presuryzowanych. Natomiast jogurty presuryzowane charakteryzowały się korzystniejszym, jednolitym skrzepem, bardziej gęstym niż skrzep jogurtów niepresuryzowanych. Nie stwierdzono zmian barwy jogurtów po presuryzacji. Podczas przechowywania zaobserwowano znaczne pogorszenie cech organoleptycznych jogurtów niepresuryzowanych, które ze względu na bardzo kwaśny smak, nie były akceptowane przez oceniających. Jogurty presuryzowane zachowały korzystne cechy smakowe do końca okresu przechowywania.

3.4. PODSUMOWANIE

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że z zastosowaniem techniki wysokich ciśnień można utrwalić jogurt. Jogurty poddane działaniu wysokich ciśnień charakteryzowały się, w trakcie przechowywania, korzystniejszymi walorami organoleptycznymi w porównaniu do jogurtów niepresuryzowanych. Należy stwierdzić, że najkorzystniejsze cechy organoleptyczne wykazywały jogurty poddane działaniu ciśnień 200-300 MPa. Zastosowanie wyższych ciśnień powodowało pogorszenie konsystencji jogurtu, co było szczególnie zauważalne po zastosowaniu ciśnień 400-600 MPa. Koniecznym byłoby, więc stosowanie stabilizatorów w celu poprawy konsystencji tak utrwalonego jogurtu. Ponadto, zastosowanie ciśnień powyżej 300 MPa, powodowało znaczną redukcję liczby pałeczek jogurtowych *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* w wyniku czego ich liczba w produkcie była znacznie niższa od zalecanego minimum tj. 10^7 jtk./g. Tak utrwalony jogurt może być jednak dobrym „nośnikiem” bakterii probiotycznych. Stwarza to możliwości kreowania produktu o nowych cechach.

Wszystkie przedstawione wyniki badań dotyczących wpływu wysokiego ciśnienia na przeżywalność bakterii jogurtowych, potwierdzają większą odporność na działanie wysokiego ciśnienia paciorkowców *Streptococcus thermophilus* w porównaniu do pałeczek jogurtowych *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Jednocześnie w wyniku przeprowadzonych badań dotyczących wpływu wysokich ciśnień na bakterie jogurtowe w jogurtach otrzymanych przy użyciu dostępnych na polskim rynku szczepionek handlowych o zróżnicowanym składzie szczepowym, potwierdzono, że wrażliwość bakterii wobec wysokiego ciśnienia jest cechą szczepową, a nie gatunkową.

Presuryzacja spowodowała osłabienie antybakteryjnego działania bakterii jogurtowych. Natomiast antybiotykooporność badanych szczepów poddanych działaniu wysokiego ciśnienia była zróżnicowana i zależała nie tylko od wysokości ciśnienia, ale również od rodzaju stosowanego w badaniach antybiotyku.

Dodatek bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* do jogurtów po presuryzacji wpłynął na poprawę ich antybakteryjnego działania. Stwierdzono również wyższą przeżywalność bakterii probiotycznych w jogurtach presuryzowanych w porównaniu do przeżywalności tych bakterii w jogurtach niepoddanych działaniu ciśnienia.

Presuryzacja spowodowała niewielki spadek kwasowości (pH) jogurtów bezpośrednio po zastosowaniu ciśnienia. Natomiast podczas przechowywania mniejsze przyrosty kwasowości stwierdzono w jogurtach poddanych presuryzacji. Zmiany kwasowości podczas przechowywania presuryzowanych jogurtów można tłumaczyć nie tylko jako wynik redukcji liczby bakterii w jogurtach bezpośrednio po presuryzacji, ale również poprzez zahamowanie aktywności kwaszącej bakterii na skutek działania ciśnienia.

Należy stwierdzić, że istnieje możliwość przedłużenia trwałości jogurtu poprzez zastosowanie wysokich ciśnień oraz produkcji jogurtu z dodatkiem bakterii probiotycznych po presuryzacji. Aktualnie trwają prace nad przygotowaniem wniosku patentowego dotyczącego zastosowania technologii wysokich ciśnień w produkcji jogurtu.

4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Mój dotychczasowy dorobek naukowy dotyczy głównie następujących zagadnień badawczych:

4.1. MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA WYSOKICH CIŚNIEŃ JAKO METODY PRZEDŁUŻANIA TRWAŁOŚCI ORAZ MODYFIKACJI CECH TECHNOLOGICZNYCH FERMENTOWANYCH PRODUKTÓW OTRZYMANYCH Z MLEKA.

4.1.1. KEFIR.

W czasie realizacji pracy doktorskiej zajmowałam się badaniami dotyczącymi wpływu wysokich ciśnień na mikroorganizmy wchodzące w skład szczepionek stosowanych do produkcji kefiru. Badania te zostały zrealizowane w ramach Grantu KBN 5 PO6G 00 417 „Wpływ wysokiego ciśnienia na wybrane bakterie fermentacji mlekowej i ich przydatność technologiczną” 1997-2000r.

W publikacji (wg załącznika nr 3) IID(5) oraz w publikacji IIA(2) opisano wpływ ciśnień 500, 700 i 1000 MPa/15 minut na aktywność metaboliczną i antybakteryjną szczepów paciorkowców i pałeczek fermentacji mlekowej izolowanych z kefiru. W wyniku działania ciśnienia 500 MPa zaobserwowano znaczne osłabienie aktywności antybakteryjnej wszystkich badanych szczepów *Lactococcus* sp. i *Lactobacillus* sp. wobec stosowanych w doświadczeniu szczepów testowych należących do gatunków *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*. Natomiast po zastosowaniu ciśnień 700 i 100 MPa stwierdzono całkowite zahamowanie aktywności antybakteryjnej badanych szczepów. Działanie ciśnienia spowodowało również obniżenie zdolności do syntezy kwasu mlekowego przez badane szczepy oraz zahamowało aktywność metaboliczną wobec stosowanych w doświadczeniu substratów.

W publikacjach IID(6) oraz IID(7) przedstawiono wpływ działania ciśnienia na drobnoustroje wchodzące w skład handlowych szczepionek kefirowych. Stwierdzono znaczną redukcję liczby mikroorganizmów wchodzących w skład szczepionki kefirowej. Najbardziej wrażliwe wobec ciśnienia były drożdże. Ich obecności nie stwierdzono w kefirze po zastosowaniu ciśnienia 400 MPa. Natomiast zastosowanie ciśnienia 800 MPa nie powodowało całkowitej redukcji paciorkowców fermentacji mlekowej. Stwierdzono znaczną redukcję liczby paciorkowców mlekowych po wydłużeniu czasu działania ciśnienia 400 MPa do 120 minut. Zaobserwowano wyższą redukcję liczby bakterii w wyniku działania ciśnienia pulsacyjnego. W

kefirze poddanym działaniu ciśnień 600, 800 i 1000 MPa nie zaobserwowano przyrostu kwasowości czynnej (pH) podczas 14 dni przechowywania w temperaturze 4°C. Stwierdzono ochronne działanie cukru, stabilizatora oraz zwiększonej zawartości s.s. (20%) na mikroorganizmy wchodzące w skład szczepionki kefirowej.

4.1.2. JOGURT.

Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałam badania dotyczące wpływu wysokiego ciśnienia na drobnoustroje, a w szczególności zajęłam się tematem wpływu wysokiego ciśnienia na bakterie stosowane do produkcji jogurtu. Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w publikacjach stanowiących cykl „Badania możliwości zastosowania wysokiego ciśnienia do przedłużenia trwałości jogurtu” który został zaprezentowany w niniejszym autoreferacie.

Prowadziłam również badania dotyczące możliwości zastosowania stabilizatorów do produkcji jogurtu utrwalonego metodą presuryzacji (publikacja IID(13)) Stwierdzono, że dodatek stabilizatora powodował ograniczenie synerezy w jogurtach presuryzowanych. Natomiast niektóre z zastosowanych stabilizatorów powodowały niekorzystne zmiany smaku jogurtów, w postaci wyczuwalnego obcego posmaku oraz wady konsystencji, określone przez oceniających, jako „piaszczystość” i „mączystość”.

4.1.3. SERV DOJRZEWAJĄCE.

Celem prowadzonych badań było określenie możliwości zastosowania wysokich ciśnień w produkcji serów dojrzewających ze szczególnym uwzględnieniem ich zastosowania do przyspieszenia procesu dojrzewania. Badania te zostały przeprowadzone w ramach Grantu KBN 3 PO6T 04 825 „Wpływ wysokiego ciśnienia na proces dojrzewania sera podpuszczkowego.” 2003-2006r.

W badaniach przedstawionych w publikacjach IID(9) i IIA(3) opisano wpływ wysokich ciśnień na aktywność enzymatyczną kultur starterowych wchodzących w skład mezofilnej szczepionki serowarskiej KAZU1. Szczepionkę poddawano rehydratacji a następnie działaniu ciśnień 200-800 MPa/15 minut w temperaturze 20°C, bezpośrednio po rehydratacji oraz po 24 godzinach. Bezpośrednio po presuryzacji oraz po 1, 2 i 3 tygodniach przechowywania w temperaturze 4°C oznaczano liczbę bakterii, aktywność kwaszącą i proteolityczną. Działanie ciśnienia powodowało nieodwracalną redukcję bakterii oraz znaczne osłabienie aktywności kwaszącej i proteolitycznej. Ponadto działaniu ciśnienia 200; 400; 600 i 800 MPa/15 minut w temperaturze pokojowej poddawano wolną od komórek suspensję zawierającą enzymy zewnątrz i wewnątrzkomórkowe. Oznaczano aktywność aminopeptydaz, dipeptydaz, endopeptydaz oraz właściwości kazeinolityczne i aktywność kwaszącą. Pod wpływem wysokiego ciśnienia stwierdzono znaczne osłabienie aktywności kwaszącej bakterii oraz duże zróżnicowanie

aktywności proteolitycznej, co umożliwia zwiększenie dodatku kultur bakteryjnych do mleka w celu przyspieszenia procesu dojrzewania sera.

W publikacji **IIA(10)** badano wpływ presuryzacji na paciorkowce fermentacji mlekowej wchodzące w skład serowarskich kultur starterowych FD-DVS Flora-Danica i FD-DVS CHN19. W doświadczeniu stosowano ciśnienie 200 MPa w czasie 5; 15; 45 i 80 minut w temperaturze 18°C. Badano również wpływ kwasowości środowiska hodowlanego i początkowej liczby bakterii na ich przeżywalność w warunkach podwyższonego ciśnienia. Najwyższy stopień redukcji bakterii stwierdzono w próbie poddanej działaniu ciśnienia 200 MPa w czasie 80 minut. Największą redukcję liczby bakterii zaobserwowano podczas pierwszych minut działania ciśnienia. Początkowa liczba bakterii oraz kwasowość hodowli miała wpływ na przeżywalność paciorkowców. Bakterie namnażane w podłożu o pH 6,4 wykazywały największą odporność wobec ciśnienia. Zarówno podwyższenie kwasowości środowiska do pH 5,6 i 4,8 jak i obniżenie do pH 7,2 spowodowało spadek przeżywalności badanych paciorkowców fermentacji mlekowej.

Badania wpływu wysokiego ciśnienia na paciorkowce fermentacji mlekowej wchodzące w skład mezofilnej szczepionki serowarskiej kontynuowano w doświadczeniu opisanym w publikacji **IIA(6)**. Podpuszczkowy ser Edamski poddawano działaniu ciśnienia 50-600 MPa czasie 5-120 minut oraz pulsacyjnie 200 i 400 MPa. Zastosowanie ciśnienia 50-200 MPa przez 30-120 min zmniejszył liczbę paciorkowców fermentacji mlekowej o 4-40%, tj. o mniej niż jeden rząd wielkości. Działanie ciśnień 400 i 600 MPa przez 30-120 minut spowodowało redukcję liczby paciorkowców fermentacji mlekowej o 99.9%, czyli w stopniu podobnym do pasteryzacji. Najwyższa liczba bakterii uległa redukcji w pierwszych 5-10 min procesu. Pulsacyjne działanie ciśnienia powodowało większą redukcję liczby bakterii w porównaniu do ciśnienia stałego.

4.2. WPLYW WYSOKICH CIŚNIEŃ NA BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ.

Część badań dotycząca tego tematu została zrealizowana w ramach Grantu KBN 5 PO6G 00 417 „Wpływ wysokiego ciśnienia na wybrane bakterie fermentacji mlekowej i ich przydatność technologiczną” 1997-2000r.

Badania dotyczące wpływu ciśnienia 400 i 600 MPa na wybrane szczepy *Streptococcus thermophilus* zostały przedstawione w publikacjach **IID(1)** i **IIA(1)**. Działanie ciśnienia 400 MPa spowodowało redukcję liczby bakterii o 2-3 rzędy wielkości, natomiast ciśnienie 600 MPa spowodowało redukcję liczby bakterii o 5-6 rzędów wielkości. Stwierdzono wydłużenie czasu fazy adaptacyjnej komórek *Streptococcus thermophilus* i skrócenie czasu generacji oraz osłabienie aktywności fermentacyjnej badanych szczepów. Stwierdzono zróżnicowanie wrażliwości wobec stosowanych ciśnień pomiędzy badanymi szczepami.

Wpływ ciśnienia na właściwości antybakteryjne wybranych szczepów *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* został przedstawiony w publikacji

IID(8). Właściwości antybakteryjne badano wobec 18 szczepów testowych należących do gatunków *Escherichia coli*, *Yersenia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*. Ciśnienia osłabiło antybakteryjne oddziaływanie szczepów *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i całkowicie zahamowało aktywność antybakteryjną szczepów *Streptococcus thermophilus*.

W publikacji **IIA(4)** opisano doświadczenie, którego celem było określenie wpływu ciśnień 300–500 MPa/15min. w temperaturze pokojowej na szczepy *Lactobacillus helveticus* 30, *Lactobacillus helveticus* 118 i *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 160 i *Lactococcus cremoris* 318. Stwierdzono, że ciśnienia 300–500 MPa powodują osłabienie aktywności kwaszającej, wszystkie szczepy wykazały jednak zdolność do hydrolizy kazeiny. Wolne od komórek ekstrakty *Lactobacillus helveticus* 118 i *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 160 znacznie różniły się w stopniu hydrolizy tych samych substratów przed i po presuryzacji. Stwierdzono wzrost aktywności endopeptydaz w ekstraktach otrzymanych z presuryzowanych bakterii.

W publikacji **IIA(7)**, badano wpływ ciśnień 30; 60; 90 i 300 MPa/1 min./18°C na przeżywalność i zdolność wzrostu w podłożach o zróżnicowanym składzie 22 szczepów *Lactobacillus*. Stwierdzono nieznaczną redukcję liczby bakterii w wyniku zastosowania ciśnień 30; 60 i 90 MPa, natomiast ciśnienie 300 MPa spowodowało znaczącą redukcję liczby bakterii *Lactobacillus*. Szczepy należące do gatunku *Lactobacillus bulgaricus* ssp. *delbrueckii* wykazywały najmniejszą barooporność.

Badania dotyczące wpływu ciśnienia, czasu działania i temperatury na wybrane właściwości szczepów *Lactobacillus acidophilus* Nestle L0937 oraz *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 przedstawiono w publikacji **IIA(8)**. W doświadczeniu stosowano ciśnienia 100 i 300 MPa przez 5, 1, 15 minut/ w temperaturze 4; 20; 37°C. Ciśnienie 100 MPa spowodowało jedynie nieznaczną redukcję liczby badanych bakterii, niezależnie od czasu i temperatury presuryzacji. Działanie ciśnienia 300 MPa przez 5 minut spowodowało znaczącą redukcję liczby bakterii. Wydłużenie czasu działania ciśnienia, nie spowodowało wzrostu redukcji liczby bakterii. Stwierdzono, że ciśnienie 300 działające w temperaturze 4°C spowodowało niższą redukcję liczby bakterii niż to samo ciśnienie działające w temperaturze 20 i 37°C. stwierdzono zróżnicowany wpływ ciśnienia na właściwości antybakteryjne badanych szczepów.

W publikacji **IID(17)** przedstawiono wyniki badań dotyczących wpływu ciśnień 30 – 150 MPa na wybrane szczepy *Lactobacillus acidophilus*. Hodowle szczepów: *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus acidophilus* T132/2 i *Lactobacillus acidophilus* T294 na mleku i na podłożu płynnym MRS poddano działaniu ciśnień 30; 60; 90; 120 i 150 MPa/1 min. Stwierdzono, że ciśnienie nie wpłynęło znacząco na przeżywalność badanych szczepów. Odnotowano wzrost aktywności kwaszającej szczepu *Lactobacillus acidophilus* T294 po

presuryzacji w hodowli na mleku. Presuryzacja wpłynęła nieznacznie na poprawę właściwości antybakteryjnych badanych szczepów *Lactobacillus acidophilus*.

Celem doświadczenia opisanego w publikacji IID(14) była ocena przydatności bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* do produkcji mlecznych napojów fermentowanych. W doświadczeniu stosowano 15 wybranych na podstawie wcześniej prowadzonej oceny szczepów należących do gatunków *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*. W celu skomponowania szczepionek do otrzymania mlecznych napojów fermentowanych badano wzajemne ich oddziaływanie antagonistyczne, oraz oznaczono aktywność kwaszącą oraz przygotowano zestawy szczepowe. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do dalszych badań dotyczący wpływu wysokich ciśnień na bakterie fermentacji mlekowej stosowane do produkcji mlecznych napojów fermentowanych.

4.3. ZASTOSOWANIE HOMOGENIZACJI WYSOKOCIŚNIENIOWEJ W MLECZARSTWIE.

W publikacji IID(3) przedstawiono wyniki badań dotyczących wpływu homogenizacji wysokociśnieniowej na właściwości fizykochemiczne mleka. W doświadczeniu stosowano ciśnienie 60-140 MPa w temperaturze 65°C. Na podstawie analizy mikroskopowej i pomiaru absorbancji (500nm), stwierdzono wzrost dyspersji kuleczek tłuszczowych wraz ze wzrostem stosowanego ciśnienia do 100 MPa, szczególnie widoczny po zastosowaniu ciśnień 20 i 40 MPa. Homogenizacja wysokociśnieniowa spowodowała również wzrost lepkości oraz obniżenie koloidalnej stabilności mleka. Stabilność cieplna i etanolowa mleka obniżyła się wraz ze wzrostem stosowanego ciśnienia, a czas podpuszczkowej koagulacji mleka uległ skróceniu, szczególnie po zastosowaniu ciśnienia 80 MPa.

4.4. ZASTOSOWANIA PREPARATÓW KOAGULUJĄCYCH W TECHNOLOGII SEROWARSTWA.

Stopień przejścia handlowych preparatów enzymatycznych „Hala”, „Chymogen” i „Fromase” z mleka do ziarna serowego badano w doświadczeniu przedstawionym w publikacji IID(2). Stwierdzono, że stopień przejścia preparatów zależał od pochodzenia preparatu, temperatury i kwasowości mleka. Stopień przejścia preparatów koagulujących z mleka do ziarna serowego wzrastał wraz ze wzrostem temperatury. Wzrost kwasowości mleka powodował również wzrost stopnia przejścia preparatów do ziarna serowego. Na stopień przejścia badanych preparatów nie miał natomiast wpływu czas koagulacji. W publikacji IID(4) opisano wpływ ciśnienia 100-1000 MPa na stopień degradacji kazeiny przez proteolityczne preparaty handlowe: „Hala”, „Chymax”, „Chymogen”, „Fromase” i „Suparen”. Presuryzacja nie spowodowała zmian stopnia degradacji kazeiny przez stosowane w doświadczeniu preparaty enzymatyczne. Stopień degradacji kazeiny zależał od pochodzenia stosowanego preparatu, nie zaobserwowano zależności pomiędzy zastosowanym ciśnieniem a stopniem degradacji kazeiny.

Mikrobiologiczne preparaty enzymatyczne są stosowane w produkcji serów dojrzewających w celu ograniczenia deficytu podpuszczki. Choć ich jakość jest porównywalna z preparatami podpuszczkowymi, to niejednokrotnie jakość serów otrzymanych przy ich użyciu odbiega od jakości tradycyjnych serów podpuszczkowych. Dlatego też, celem badań opisanych w publikacji **IID(10)** była ocena zastosowania preparatu pleśniowego z *Rhizomucor miehei* N do produkcji serów Camembert, Edamskiego oraz Cheddar. Stwierdzono, że zastosowanie proteiny pleśniowej wpłynęło na intensyfikację procesów proteolizy i lipolizy w serach, co miało korzystny wpływ na ich cechy sensoryczne.

4.5. ZAMRAŻALNICZE PRZECHOWYWANIA SERA.

Zróznicowanie w ciągu roku dostaw mleka do zakładów mleczarskich powoduje sezonowe wahania w produkcji serów. Niższe dostawy mleka w okresie zimowym ograniczają produkcję sera. Natomiast w okresie letnim na rynku występuje nadmiar sera, co powoduje problemy z jego zbyciem. Dlatego też do czasu osiągnięcia równomiernych dostaw mleka w ciągu całego roku, problemem jest przechowywanie serów. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie zamrażalniczego przechowywania serów.

Celem badań opisanych w publikacji **IIA(5)** było określenie możliwości zamrażalniczego przechowywania sera Edamskiego. Ser został poddany soleniu przez 100; 75; 50 i 25% normatywnego czasu jego solenia. Ser po 5 tygodniach dojrzewania oraz ser bezpośrednio po soleniu był przechowywany w temperaturze -27°C przez 6 i 12 miesięcy. Proces dojrzewania w serze zamrożonym bezpośrednio po soleniu, prowadzono po jego rozmrożeniu. Stwierdzono, że sery o krótszym o 50 i 75% czasie solenia w stosunku do czasu normatywnego, dojrzewały szybciej. Nie stwierdzono istotnego wpływu mrożenia na strukturę sera. Zawartość soli w serach mrożonych i niemrożonych kształtowała się na zbliżonym poziomie. Podczas zamrażalniczego przechowywania serów wcześniej poddanych dojrzewaniu, stwierdzono nieznaczną degradację białek. Proces dojrzewania przebiegał szybciej w serach dojrzewających po rozmrożeniu w porównaniu do serów dojrzewających bezpośrednio po soleniu.

Celem badań przedstawionych w publikacji **IID(12)** było określenie wpływu przechowywania w temperaturze -22°C przez 31 dni na dyfuzję wody i soli w serze Edamskim. Ser poddawano dojrzewaniu przez 12 tygodni, a następnie zamrażano, część sera zamrożono po soleniu, a proces dojrzewania przez 12 tygodni prowadzono po rozmrożeniu. Stwierdzono, że zamrażalnicze przechowywanie sera edamskiego wpływa na szybsze wyrównanie zawartości między badanymi warstwami sera podczas jego dojrzewania po rozmrożeniu natomiast nie wpływa na dyfuzję soli w serze. Ponadto, zamrażanie powoduje nieznaczne przyspieszenie procesu degradacji białek sera podczas dojrzewania po rozmrożeniu. Stwierdzono zmniejszenie twardości

sera dojrzewającego po rozmrożeniu przy niezmiennych pozostałych cechach organoleptycznych.

W publikacji **IIA(9)** opisano badania dotyczące wpływu zamrażania na jakość sera Gouda. Sery zamrażano bezpośrednio po soleniu oraz po 2, 4, 6, 10 i 12 tygodniach dojrzewania i przechowywano w temperaturze -22°C przez 31 dni. Po rozmrożeniu sery poddawano dojrzewaniu, tak aby łączny jego czas wynosił 12 tygodni. Najlepsze cechy jakościowe wykazywały sery zamrożone po 6, 8 i 10 tygodniach dojrzewania, a następnie dojrzewające przez dalsze 6, 4 i 2 tygodnie po rozmrożeniu.

Pozytywne wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań dotyczących zamrażalniczego przechowywania serów skłaniają do kontynuacji dalszych badań dotyczących tego tematu.

Podczas realizacji badań współpracowałam z Instytutem Wysokich Ciśnień PAN oraz Spółdzielnią Mleczarską „Mlekpól” – Zakład Produkcyjny Mrągowo, Danisco-Biolacta Sp.z o.o.

Jestem również współautorką publikacji przeglądowych dotyczących następujących zagadnień:

4.6. WPLYW WYSOKIEGO CIŚNIENIA NA PLAZMINĘ – ENZYM RODZIMY MLEKA.

W publikacji **IID(11)** opisano wpływ wysokiego ciśnienia na plazminę. Z przedstawionych danych literaturowych wynika, że plazmina wykazuje wysoką oporność wobec działania ciśnień w zakresie 50-800 MPa. Dotychczasowe badania wskazują, że wysokie ciśnienie, działające w temperaturze pokojowej może jedynie obniżyć aktywność plazminy. Jednak do pełnej jej inaktywacji niezbędne jest jednoczesne działanie ciśnienia i temperatury

4.7. AMINY BIOGENNE W ŻYWNOŚCI.

W publikacji **IID(15)** przedstawiono dane literaturowe dotyczące występowania amin biogennych w serach dojrzewających. Niektóre drobnoustroje obecne w serze mają zdolność formowania amin biogennych z wolnych aminokwasów powstających podczas dojrzewania sera. W serach twardych długo dojrzewających zawartość amin biogennych jest wyższa niż w serach półtwardych i miękkich. Zawartość amin biogennych zarówno w aspekcie ilościowym jak i jakościowym, w serach tego samego gatunku, może być zróżnicowana w zależności od producenta. Największy wpływ na zawartość amin biogennych ma efektywność pasteryzacji mleka. Przez dobór szczepowy składu szczepionki serowarskiej można również zmniejszyć zawartość amin biogennych w serze.

4.8. ZASTOSOWANIA DWUTLENKU WĘGLA DO UTRWALANIA MLEKA.

W publikacji **IID(16)** opisano możliwość zastosowania dwutlenku węgla w celu zapewnienia jakości mikrobiologicznej mleka surowego. Obecne w mleku bakterie psychrotrofowe mogą rozwijać się w temperaturze powyżej 5°C . Schłodzenie mleka do temperatury $7-10^{\circ}\text{C}$, nie zabezpiecza więc w wystarczający sposób przed aktywnością ich enzymów proteolitycznych i

lipolitycznych. Zastosowanie dwutlenku węgla w chłodniczym przechowywaniu mleka surowego może zabezpieczyć i poprawić jego przydatność technologiczną ze względu na ograniczenie rozwoju bakterii Gram-ujemnych, w tym również bakterii psychrotrofowych.

4.9. POLIMORFIZM BIAŁEK MLEKA I ICH PRZYDATNOŚĆ DO PRODUKCJI SERA.

Za skład aminokwasowy frakcji białek mleka, a tym samym przydatność mleka do wyrobu serów, odpowiadają geny w strukturze DNA. W publikacji IID(18) wykazano, że przez inseminację krów można wpływać na układ genów odpowiadających za syntezę poszczególnych frakcji białek mleka. Mleko od krów z genotypem BB β -laktoglobuliny i genotypem BB κ -kazeiny zawiera więcej kazeiny a mało białek serwatkowych. Mleko to, wykazuje dobrą krzepliwość w czasie warzenia sera. Spośród buhajów, których używa się do inseminacji krów tylko nieliczne mają korzystne genotypy dla obu genów. Poprzez ukierunkowaną inseminację krów można wpływać na skład chemiczny mleka, a tym samym na jego przydatność do wyrobu serów.

5. ZESTAWIENIE LICZBOWE DOTYCZĄCE DOROBKU HABILITACYJNEGO

RODZAJ PUBLIKACJI	PRZED UZYSKANIEM STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA			PO UZYSKANIU STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA			ŁĄCZNIE
	Liczba	IF*	Punkty MNiSW**	Liczba	IF*	Punkty MNiSW**	
Oryginalne prace twórcze:							
- w czasopismach krajowych				3		24	
- w czasopismach zagranicznych	1	0,645	15	15	8,075	290	
Rozdziały w monografiach							
- w języku polskim				1		4	
- w języku angielskim	5		25	3		15	
Artykuły przeglądowe, popularno-naukowe, popularyzujące				4		12	
Publikacje w recenzowanych materiałach konferencyjnych uwzględnionych w WOS	4		40	1		10	
Komunikaty naukowe prezentowane na konferencjach							
- krajowych	5			10			
- zagranicznych	8			18			
Prace niepublikowane							
- sprawozdania z grantów,							
- ekspertyzy	1			2			
Liczba	24			57			81
Impact Factor*		0,645			8,075		8,720
Punkty MNiSW**			80			355	435

* za rok opublikowania

** zgodnie z listą MNiSW 2012r.

Odsetym 22.07.2013r.

Agnieszka Janowska