
AUTOREFERAT

OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

DR INŻ. JAROSŁAW KOWALIK

KATEDRA MLECZARSTWA I ZARZĄDZANIA JAKOŚCIĄ
WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE
10-719 OLSZTYN, UL. OCZAPOWSKIEGO 7
TEL. 89 523 43 39
e-mail: j.kowalik@uwm.edu.pl

OLSZTYN 2016

SPIS TREŚCI

I.	DANE OSOBOWE.....	3
II.	POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE.....	3
III.	INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	4
IV.	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.....	5
	A) TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA.....	5
	B) PUBLIKACJE NAUKOWE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	5
	C) OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	7
V.	OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH.....	21
VI.	PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWO-BADAWCZEGO.....	32

JAROSŁAW KOWALIK

I. DANE OSOBOWE

Adres zamieszkania: ul. Brylantowa 32, 10-698 Olsztyn

Adres służbowy: ul. Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn

K: +48 604 800 096

T: +48 89 523 43 39

e-mail: j.kowalik@uwm.edu.pl

Data i miejsce urodzenia: 08.04.1978 r. Włoszczowa

II. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

Magister inżynier technologii żywności i żywienia człowieka, specjalność: technologia mleczarska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
2002

Praca magisterska pt.: *Ocena wybranych właściwości fermentacyjnych i proteolitycznych szczepu *Bifidobacterium animalis* 30*

Promotor: prof. dr hab. Stefan Ziajka

Doktor nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, specjalność: mikrobiologia mleczarska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności
2007

Tytuł rozprawy: *Badania nad szacowaniem ryzyka mikrobiologicznego produktów mleczarskich*

Promotor: prof. dr hab. Stefan Ziajka

Dyplom Menedżera Badań Naukowych i Prac Rozwojowych

2012

Polska Fundacja Ośrodków Wspomagania Rozwoju Gospodarczego „OIC Poland”

Wyższa Szkoła Ekonomii i Innowacji w Lublinie

Praca dyplomowa pt.: *Innowacje w projektowaniu bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów ready-to-cook*

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Doktorant

01.12.2002-30.06.2007

Dzienne studia doktoranckie

Wydział Nauki o Żywności

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Technolog

01.12.2006-30.08.2007

Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością

Wydział Nauki o Żywności

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Specjalista

01.09.2007-31.10.2008

Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością

Wydział Nauki o Żywności

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Adiunkt

01.11.2008-dotychczas

Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością

Wydział Nauki o Żywności

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

IV. 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

Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej w zarządzaniu bezpieczeństwem żywności w przetwórstwie mleka.

Rozprawę habilitacyjną stanowi powiązany tematycznie cykl publikacji. Prace zostały zrealizowane po doktoracie i są rozszerzeniem badań w zakresie mikrobiologii prognostycznej, których inspiracją był projekt rozwojowy realizowany w Katedrze Mleczarstwa i Zarządzania Jakością pod kierownictwem prof. dr hab. Stefana Ziajki pt. „Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej do modelowania bezpieczeństwa żywności” (NCBiR - N R12 0097 06), a który realizowano w latach 2008-2013. Byłem współautorem koncepcji, a w trakcie realizacji projektu jako wykonawca uczestniczyłem w pracach ustalania metodyki badawczej, realizacji badań w laboratorium mikrobiologicznym i merytorycznej analizie oraz dyskusji wyników.

B) PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

1. **Kowalik J.**, Łobacz A., Tarczyńska A.S., Ziajka S. 2009. *Zastosowanie mikrobiologicznych modeli prognostycznych w produkcji bezpiecznej żywności*. Medycyna Weterynaryjna, 65(06), 381-381.

IF¹ = 0; punkty MNiSW² = 15; Liczba cytowań³ = 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, doborze źródeł literaturowych, dokonaniu wyboru zastosowanych metod analizy przypadku, napisaniu publikacji. Mój udział procentowy wynosi 55%.

2. **Kowalik J.**, Tarczyńska A.S., Łobacz A. 2013. *Prognozowanie wzrostu liczby komórek *Listeria monocytogenes* w serku wiejskim*. Żywność, Nauka, Technologia, Jakość, 4 (89), 37 – 48.

IF¹ = 0,190; punkty MNiSW² = 13; Liczba cytowań³ = 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, planowaniu doświadczenia, doborze metod analitycznych, nadzorze nad wykonywanymi badaniami, analizą i interpretacją wyników, współudziale w pisaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

3. **Kowalik J.**, Adamczewski K., Ziajka S. 2014. *Szacowanie wzrostu liczby komórek *Listeria monocytogenes* z wykorzystaniem urządzenia impedymetrycznego w serze mozzarella*. Żywność, Nauka, Technologia, Jakość, 1 (92), 66-77.

IF¹ = 0,311; punkty MNiSW² = 13; Liczba cytowań³ = 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, planowaniu doświadczenia, doborze metod analitycznych, nadzorze nad wykonywanymi analizami, interpretacją wyników, współudziale w pisaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

4. **Kowalik J.**, Łobacz A., Adamczewski K., Tarczyńska A.S. 2014. *Zastosowanie alternatywnych metod oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego wybranych serów*. Żywność, Nauka, Technologia, Jakość, 5 (96), 134 – 143.

IF¹ = 0,311; punkty MNiSW² = 13; Liczba cytowań³ = 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, planowaniu doświadczenia, doborze metod analitycznych, nadzorze nad wykonywanymi analizami i interpretacją wyników, współudziale w pisaniu publikacji. Mój udział procentowy wynosi 60%.

5. Łobacz A., **Kowalik J.** 2015. *A predictive model for Listeria monocytogenes in UHT dairy products with various fat content during cold storage*. Journal of Food Safety, 35, 119–127.

IF¹ = 0,931; punkty MNiSW² = 20; Liczba cytowań³ = 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na doborze literatury, interpretacji wyników badań, merytorycznym wsparciu podczas analiz laboratoryjnych. Mój udział procentowy wynosi 40%.

6. **Kowalik J.**, Łobacz A. 2015. *Development of a predictive model describing the growth of Yersinia enterocolitica in camembert- type cheese*. International Journal of Food Science and Technology, 50, 811–818.

IF¹ = 1,354; punkty MNiSW² = 25; Liczba cytowań³ = 1

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, planowaniu doświadczenia, doborze metod analitycznych, nadzorze nad wykonywanymi analizami i interpretacją wyników oraz współudziale w pisaniu publikacji. Mój udział procentowy wynosi 60%.

Łącznie

IF¹ = 3,097

Punkty MNiSW² = 99

Liczba cytowań³ = 1

¹Impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania

² Punkty MNiSW - Załącznik do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 23 grudnia 2015 r.

³ Liczba cytowań według Web of Science na dzień 16 marca 2016 roku.

Nadmieniam, że 5 z 6 publikacji stanowiących skład osiągnięcia naukowego to publikacje z ostatnich 3 lat. Czasopismo: Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, w którym znajdują się 3 publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego w latach ich opublikowania znajdowało się na liście JCR.

C. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

1. Wprowadzenie

Poprawa jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów spożywczych wprowadzanych na rynek wynika z wdrożenia i ciągłego doskonalania systemów zarządzania jakością (Kołożyn - Krajewska i Jałosińska – Pieńkowska, 2003). Podstawowymi i obligatoryjnymi w Polsce systemami, które mają za zadanie zapewnić bezpieczeństwo żywności są: GHP (ang. Good Hygiene Practice), GMP (ang. Good Manufacturing Practice) oraz system HACCP (ang. Hazard and Critical Control Point) (Dz. U. 2006 r. nr 171, poz. 1225). W trosce o dobro konsumenta producenci żywności wdrażają dobrowolne Systemy Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności np. ISO 22000:2005 (Systemy zarządzania bezpieczeństwem żywności. Wymagania dla każdej organizacji należącej do łańcucha żywnościowego). Systemy zarządzania bezpieczeństwem produkowanej żywności powinny być opracowane w sposób zrozumiały dla wszystkich podmiotów działających w łańcuchu żywnościowym. Powinny również stanowić dowód dla opinii publicznej, że posiadają skuteczne środki kontroli, gwarantujące bezpieczeństwo spożywanej przez konsumentów żywności. Narzędziem wspierającym działanie systemów zarządzania jakością jest mikrobiologia prognostyczna. Jest to dział mikrobiologii żywności wykorzystujący elementy matematyki w celu określania zachowania mikroorganizmów (głównie chorobotwórczych) w produkowanej i dystrybuowanej żywności (Kajak 2001; Łobacz i in. 2008; McKellar i Lu 2004). Mikrobiologia prognostyczna wykorzystuje zasadę, że reakcja grup mikroorganizmów w określonych warunkach w żywności jest powtarzalna. Informacja dotycząca składu chemicznego, stosowanej technologii i wiedzy na temat mikroflory produkowanej żywności pozwala na wybór możliwie bezpiecznego modelu prognostycznego, czyli takiego, który będzie prognozował wzrost drobnoustrojów w sposób najbardziej zbliżony do wzrostu w warunkach rzeczywistych (Giffel i Zwietering 1999). W celu wykorzystania modelu matematycznego do prognozowania i analizowania wzrostu niepożądanych mikroorganizmów, np. podczas produkcji żywności, należy wykonać szereg badań mikrobiologicznych na produkcie modelowym w warunkach eksperymentalnych, a następnie dokonać jego walidacji w oparciu o konkretny produkt żywnościowy (Scott 2005). Do badań laboratoryjnych w aspekcie ich wykorzystania w mikrobiologii prognostycznej oprócz klasycznej metody płytkowej można zastosować właściwie wykalibrowane urządzenia wykorzystujące zjawisko impedancji, które mogą przyczynić się do krótszej w czasie analizy mikrobiologicznej żywności. Uzyskane w ten sposób wyniki badań i zwalidowane modele matematyczne mogą być użyte do ilościowego szacowania ryzyka mikrobiologicznego w czasie rzeczywistym (McMeekin and Ross 2002; Kowalik i in.

2012). Modele prognostyczne mogą mieć istotne zastosowanie podczas wdrażania systemu HACCP na co najmniej 3 etapach: przeprowadzenia analizy zagrożeń i określenia środków nadzoru, ustalenia poziomów docelowych i limitów krytycznych dla każdego krytycznego punktu kontrolnego oraz podczas ustalania procedur weryfikacji. W ostatnich latach wzrosło również zainteresowanie mikrobiologią prognostyczną, która może połączyć wymagania w zakresie zapewnienia bezpieczeństwa żywności z jego oczekiwanym wpływem na zdrowie publiczne.

Warto również nadmienić, że FAO/WHO (ang. Food and Agriculture Organization/World Health Organization) w 2002 r. zdecydowała o włączeniu zasad mikrobiologicznego zarządzania ryzykiem w rozwój standardów bezpieczeństwa żywności. Oznacza to, że wymagania ustawowe winny być uzasadnione na podstawie udokumentowanej, wspartej naukowo analizie ryzyka i odnosić się do odpowiedniego poziomu ochrony ustalonego przez Światową Organizację Handlu WTO (ang. World Trade Organization). Ponadto, zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 178/2002: „Ocena ryzyka powinna opierać się na istniejących dowodach naukowych i być podejmowana w sposób niezależny, obiektywny i przejrzysty”, wobec czego mikrobiologia prognostyczna staje się skutecznym narzędziem również w ujęciu prawa (Rozp. WE 178/2002; Tarczyńska i in. 2012). Ilościowa analiza ryzyka powinna być podstawą rozstrzygania sporów w kwestiach dotyczących zagrożeń mikrobiologicznych w produkowanej żywności, skutków zatruc pokarmowych oraz umożliwiać znalezienie i ustalenie przyczyn zaistniałych sytuacji. Analiza ilościowa to również jedno z możliwych do wykorzystania zastosowań mikrobiologii prognostycznej (Gorris 2005).

Rozwój technik komputerowych i powszechnie dostępny Internet sprzyjają powstawaniu baz danych dotyczących zachowania się głównych patogenów oraz drobnoustrojów odpowiedzialnych za psucie żywności. Zawarte w nich dane o doświadczeniach wykonanych na produktach modelowych z użyciem programów komputerowych (tzw. modele trzeciorzędowe) stanowią źródło cennych informacji dla osób zajmujących się analizą ryzyka mikrobiologicznego na każdym etapie łańcucha żywnościowego. Do znanych i często stosowanych programów prognozujących zachowanie się niepożądanych drobnoustrojów w symulowanych warunkach żywności i mających zastosowanie w analizie ryzyka mikrobiologicznego należy: Pathogen Modeling Program (PMP) Online (dostępny na stronie internetowej amerykańskiego Departamentu ds. Rolnictwa, USDA), ComBase Predictor, Perfingers Predictor, ComBase DMFiT (zawarte w bazie danych ComBase) (www.combase.cc). Są to ogólnodostępne i bezpłatne bazy danych z programami do prognozowania. Umożliwiają one użytkownikowi wyszukanie dostępnych w bazie wyników badań, po wcześniejszym zawężeniu wyszukiwania do określonego mikroorganizmu oraz warunków środowiska (np. temperatura, pH, aktywność wody) (McMeekin i in. 2006; Łobacz i in. 2013). Baza danych ComBase stanowi cenne źródło wiedzy na temat bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności, zawiera już ponad 50 000 rekordów (t.j. obserwacji opisujących reakcje bakterii na określone warunki środowiska) i jest systematycznie rozbudowywana.

Większość dostępnych modeli prognostycznych konstruowano przeważnie w oparciu o badania na pożywkach mikrobiologicznych, które nie odzwierciedlają wszystkich czynników fizykochemicznych panujących w żywności. Stąd też wynika potrzeba

prowadzenia badań w kierunku opracowywania modeli dla konkretnych produktów spożywczych. Przykładem portalu, w którym zamieszczono modele opracowane dla konkretnych produktów spożywczych jest Wama Predictor (WMP) (wamapredictor.uwm.edu.pl/WamaPredictor/). Portal ten jest rezultatem wspomnianego projektu rozwojowego. Po zarejestrowaniu i zalogowaniu użytkownika portal umożliwia prezentację symulacji kinetyki zmian populacji różnych gatunków bakterii, zgodnie z opracowanymi modelami matematycznymi. Modele zamieszczone w bazie skonstruowano na podstawie wyników badań uzyskanych na produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego (produkty mleczarskie: jogurt, kefir, mleko pasteryzowane, mleko UHT, sery miękkie z porostem i przerostem pleśni, sery dojrzewające typu holenderskiego, feta, mozzarella oraz twarogi). Podczas badań naukowych pozwalających na powstanie tego portalu analizowano zachowanie bakterii chorobotwórcze z gatunku: *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli* w zakresie temperatur przechowywania 0-25°C. Portal powstał w rezultacie realizacji projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR - N R12 0097 06). Na dzień 20. grudnia 2015 roku zanotowano ok. 3 tys. wejść do portalu z różnych instytucji (nauka i przemysł).

Ważne jest aby badania naukowe przyczyniły się do powstania jak największej liczby użytecznych modeli matematycznych opisujących wzrost/przeżywalność drobnoustrojów w różnych produktach spożywczych. Gotowe modele bazujące na pożywkach mikrobiologicznych często są przeszacowane i nie odzwierciedlają rzeczywistego zachowania drobnoustrojów w żywności.

Dlatego też, po ich walidacji na podstawie modeli uzyskanych z badań na produktach spożywczych mogą one stanowić ważne źródło informacji odnośnie ich wykorzystania w różnych sytuacjach np. czy przetworzyć lub wycofać z dystrybucji środek spożywczy.

Wdrażanie elementów mikrobiologii prognostycznej w produkcji i dystrybucji produktów spożywczych może przynieść korzyści zarówno dla wielu środowisk, a mianowicie nauki, przemysłu oraz dla konsumentów. W nauce, pozwalają zrozumieć i określić zachowanie mikroorganizmów w zależności od etapu procesu technologicznego i dystrybucji żywności. Dla przemysłu korzyścią jest obniżenie kosztów spełnienia obowiązujących przepisów poprzez dostarczenie tanich i prostych w użytkowaniu środków weryfikacji, że procesy produkcyjne są bezpieczne, zaś dla konsumentów wnoszą poprawę standardów związanych z bezpieczeństwem spożywanej żywności.

2. Cel i zakres badań

Głównym celem podjętych badań była ocena zachowania wybranych patogenów, a także rozwój modeli prognostycznych i ich walidacja dla szerokiej gamy produktów mleczarskich.

Wyznaczono następujące cele szczegółowe:

- Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej do określania zachowania patogenów w sytuacji hipotetycznego zanieczyszczenia produktu mleczarskiego, w trakcie jego produkcji i dystrybucji z wykorzystaniem dostępnych internetowych baz danych zawierających opracowane modele matematyczne;

- Porównanie prognozowanego i obserwowanego wzrostu liczby komórek *Listeria monocytogenes* na przykładzie zanieczyszczonego serka wiejskiego (cottage cheese);
- Badania nad dostosowaniem urządzeń impedymetrycznych Bactometer M64, (bioMerieux) i Bactrac 4300 (SyLab) do ilościowego, selektywnego oznaczania *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus* podczas przechowywania serów typu feta i mozzarella oraz wykorzystanie uzyskanych wyników do opracowania modeli;
- Opracowanie i walidacja drugorzędowych modeli matematycznych zachowania pałeczek *Listeria monocytogenes* w mleku i śmietance UHT w zależności od różnej zawartości tłuszczu, a także pałeczek *Yersinia enterocolitica* w serze typu camembert podczas chłodniczego przechowywania.

3. Dokumentacja wyników i wnioski

W badaniach przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wykorzystano produkty mleczarskie: mleko i śmietanka UHT oraz różnego rodzaju sery (cottage cheese, feta oraz mozzarella). Sery te wykorzystywane są m.in. do przyrządzania różnego rodzaju sałatek, dań gotowych do spożycia gdzie istnieje możliwość ich zanieczyszczenia bakteriami chorobotwórczymi. Dobór gatunków bakterii: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* i przetrwalnikujące laseczki *Bacillus cereus* wynikał z ich możliwości bytowania i rozwoju w środowisku produkcji i dystrybucji. Badania realizowano głównie w przedziale temperatur od 3 do 15°C, czyli w warunkach umożliwiających wzrost bakterii psychrotrofowych jakimi są pałeczki *Listeria* i *Yersinia*. Za poziom początkowy mikroorganizmów, którymi zanieczyszczano produkty przyjęto log 2-3 jtk/g. Jest to realny poziom zanieczyszczenia, który może wystąpić w produkcji i dystrybucji żywności. Badania empiryczne dla każdego produktu prowadzono do uzyskania maksymalnej liczby populacji drobnoustrojów. Doświadczenia wykonano dla 5 różnych partii produktów (im więcej powtórzeń doświadczenia tym bardziej poprawne prognozy).

Do analiz mikrobiologicznych wykorzystano systemy impedymetryczne z nowatorsko opracowaną pożywką selektywną wobec komórek *Listeria monocytogenes*. Wybór gatunku *Listeria monocytogenes* do jego ilościowego określania w systemie impedymetrycznym, podyktowany był wymaganiami prawa żywnościowego (mikrobiologiczne kryteria bezpieczeństwa zawarte w Rozporządzeniu WE 2073/2005).

Etap 1.

Na tym etapie przeanalizowano możliwości zastosowania dostępnych programów mikrobiologii prognostycznej w celu oszacowania rozwoju wybranego patogenu (pałeczka *Yersinia enterocolitica*) podczas produkcji i dystrybucji serka wiejskiego (cottage cheese). Cottage cheese, w zależności od metody produkcji, jest niedojrzewającym twarożkiem kwasowym lub kwasowo-podpuszczkowym o strukturze ziarnistej. Ziarna serka są zanurzone w śmietance.

Z danych literaturowych wynika, że obecność mikroorganizmów chorobotwórczych w tego typu serkach pochodzi z zanieczyszczeń wtórnych, których głównym źródłem jest

personel, brak higieny oraz błędy technologiczne. Duże zagrożenie w produkcji i dystrybucji cottage cheese może stanowić względnie beztlenowa Gram-ujemna pałeczka *Yersinia enterocolitica*. Do oszacowania wzrostu lub inaktywacji tej bakterii w wybranym odcinku łańcucha produkcji zastosowano program Combase Predictor (CP). W programie należy wprowadzić dane dotyczące głównych parametrów fizykochemicznych produktu i procesów podczas produkcji. Są to niezbędne informacje do przeprowadzenia symulacji wzrostu bakterii patogennych podczas poszczególnych etapów produkcji cottage cheese. W tym celu, określono temperaturę i czas trwania analizowanych etapów produkcji oraz pH, zawartość NaCl i kwasu mlekowego. Za poziom początkowy liczby *Y. enterocolitica* przyjęto 2 log jtk/g produktu. Poziom wyjściowy zanieczyszczenia bakterią *Y. enterocolitica* poprzedzający proces był poziomem wejściowym (początkowym) kolejnego. W doświadczeniu rozpatrywano następujące etapy produkcji: 1) koagulacja mleka pasteryzowanego (czas koagulacji: 5h, temperatura: 32°C, pH skrzepu: 4,6), 2) krojenie i dogrzewanie skrzepu (czas procesu: 3h, temperatura: 52°C, pH: 4,6), 3) odwadnianie (odprowadzenie serwatki), chłodzenie, dodatek soli kuchennej, natłuszczanie śmietanką i pakowanie (czas procesu: 8h, temperatura: 5°C, pH: 5,1, kwas mlekowy: 7700 ppm, NaCl: 0,5%) oraz 4) magazynowanie i dystrybucja (czas: 504 h, temp. 6°C, pH: 5,1, kwas mlekowy: 7700 ppm, NaCl: 0,5%). Program CP uwzględniał również dane dotyczące stanu fizjologicznego (SF) bakterii, czyli w jaki sposób badany drobnoustrój reaguje na zmiany aktualnego środowiska, np. stres związany ze zmianą temperatury, pH czy ciśnienia osmotycznego (wartość SF = 0, brak wzrostu, SF = 1, rozwój optymalny). W opracowaniu zastosowano opcję domyślnego wyboru wartości SF, sugerowaną przez program. Po etapie koagulacji mleka na podstawie modelu wzrostu zawartego w programie CP, nastąpił nieznaczny wzrost liczby komórek *Yersinia* z 2 log jtk/g do poziomu 2,75 log jtk/g. Kolejny proces, którym jest krojenie i dogrzewanie spowodował destrukcję analizowanego gatunku bakterii w czasie 0,3 h. W tym momencie produkt należało uznać za bezpieczny, lecz w przypadku gdyby doszło do wtórnego zanieczyszczenia (na poziomie 2,0 log jtk/g) wzrost liczby komórek *Yersinia* byłby nieunikniony. Rozpatrując czas i warunki odwadniania, chłodzenia, dodatku NaCl oraz natłuszczania i pakowania serka zaprognozowano nieznaczny wzrost liczby komórek *Y. enterocolitica*, których poziom 2,03 log jtk/g utrzymywał się do etapu magazynowania i dystrybucji. Przy zachowaniu łańcucha chłodniczego, i terminu przydatności do spożycia (21 dni) według prognozy CP byłaby możliwość wzrostu liczby komórek *Y. enterocolitica* do log 8,30 jtk/g produktu. Minimalna dawka infekcyjna w przypadku tej bakterii wynosi ok. log 8-9 jtk/g, tak więc wyprodukowany serek mógłby stwarzać potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka.

Przedstawione wyniki opisano w publikacji:

1. **Kowalik J.**, Łobacz A., Tarczyńska A.S., Ziajka S. 2009. *Zastosowanie mikrobiologicznych modeli prognostycznych w produkcji bezpiecznej żywności*, Medycyna Weterynaryjna, 65(06), 381-381(Załącznik 4: Wykaz, pkt. IB: 1).

Etap 2.

Analizy z pierwszego etapu posłużyły do badań empirycznych, podczas których wykorzystano gatunek bakterii o podobnych wymaganiach środowiska, a mianowicie *Listeria monocytogenes*. Podczas tego etapu przedstawiono możliwości rozwoju pałeczek *Listeria monocytogenes* w serku cottage cheese. Wybór tego produktu do badań uzasadniają jego właściwości fizykochemiczne, które potencjalnie sprzyjają rozwojowi pałeczek *Listeria*. Obecność komórek *Listeria* w produktach wyprodukowanych w UE reguluje Rozporządzenie Komisji Europejskiej nr 2073/2005. Zachowanie właściwej temperatury w łańcuchu chłodniczym jest bardzo ważnym czynnikiem decydującym o wzroście liczby drobnoustrojów niepożądanych.

Podczas badań określono możliwości rozwoju pałeczek *Listeria monocytogenes* (szczepy referencyjne ATTC: 0232S, 0737S, 0398S) (Microbiologics) w serku cottage cheese podczas przechowywania w zakresie temperatur od 3 do 15 °C. Dokonano próby wykorzystania mikrobiologii prognostycznej do określenia stabilności mikrobiologicznej produktu w przypadku różnicy parametrów technologicznych i powstałych w ich wyniku zmian fizykochemicznych. Oszacowano również konsekwencje ewentualnego przerwania łańcucha chłodniczego w czasie przechowywania i dystrybucji produktu.

Próbki zanieczyszczono właściwym rozcieńczeniem hodowli *Listeria* w ilości zapewniającej koncentrację na poziomie log 3 jtk/g i przechowywano w temperaturze 3, 6, 9, 12 oraz 15 °C. Do analizy liczby komórek *L. monocytogenes* wykorzystano podłoże Chromocult Agar, wybiórcze dla *Listeria* wg Ottaviani i Agosti. Czas przechowywania, po którym wykonywane były analizy zależał od tempa wzrostu badanego mikroorganizmu w produkcji.

Na podstawie badań eksperymentalnych opracowano modele pierwszorzędowe z wykorzystaniem aplikacji ComBase DMFit. Aplikacja ta znajduje się w bazie ComBase i umożliwia na podstawie uzyskanych wyników badań wyliczenie parametrów wzrostu bakterii (wykorzystując równanie różniczkowe Baranyi i Roberts'a). Aplikacja dopasowuje parametry modelu do danych eksperymentalnych i generuje na tej podstawie optymalne prognozy. W celu porównania uzyskanych prognoz wygenerowano modele w programie CP. W programie tym ustawiono parametry zbliżone do właściwości fizykochemicznych badanych serów. W wyniku modelowania pierwszorzędowego uzyskano współczynniki tempa wzrostu liczby komórek bakterii ($\mu[\log \text{ jtk/g/h}]$) (w każdej temperaturze eksperymentu) oraz prognozowane tempo wzrostu (wyliczone w programie CP). Dokonano oceny dopasowania modeli pierwszorzędowych do obserwowanych danych poprzez wyliczenie wartości błędu średniokwadratowego MSE (ang. Minimal Square Error). Następnie w aplikacji DMFit (wykorzystując tempo wzrostu obserwowane i prognozowane w CP) uzyskano współczynniki tempa wzrostu na podstawie drugorzędowego modelu pierwiastka kwadratowego Ratkowsky'ego. Wykonano walidację graficzną i matematyczną wygenerowanych modeli za pomocą wykresu równości (modele pierwszorzędowe) i wyliczeń współczynników: odchylenia B_f (ang. Bias factor) oraz A_f (ang. Accuracy factor) dla modeli drugorzędowych. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem temperatury następowało szybsze tempo wzrostu liczby komórek *Listeria*. Na podstawie wyliczeń w DMFit określono wartości współczynników tempa wzrostu *L. monocytogenes*, które wynosiły odpowiednio w: 3°C –

0,0066 [h⁻¹], 6 °C – 0,0080[h⁻¹], 9 °C – 0,0121[h⁻¹], 12 °C – 0,0139 [h⁻¹] oraz 15 °C – 0,0197 [h⁻¹]. Następnie wygenerowano prognozy dla podobnych parametrów środowiska: temperatura, czas, pH, zawartość kwasu mlekowego w programie CP.

Na podstawie wyliczeń stwierdzono, że błąd MSE obliczony dla sum błędów wartości obserwowanych (DMFit) i prognozowanych (CP) wynosił 0,00031, co wskazywało na dobre dopasowanie modelu. Walidacja graficzna pozwoliła stwierdzić dobrą przydatność prognoz uzyskanych w CP. Prognozowane w CP wartości tempa wzrostu w większości przypadków miały wyższą wartość niż obserwowane, co potwierdziło wysoki margines bezpieczeństwa predykcji.

Biorąc powyższe pod uwagę wykonano modelowanie drugorzędowe (wykorzystując równanie Ratkowsky`ego) i uzyskano możliwość prognozy tempa wzrostu *Listeria* w zależności od temperatury przechowywania. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że program CP dla określonych warunków środowiska (cottage cheese) pozwolił na bezpieczne prognozy tempa wzrostu *Listeria* w zakresie temperatury przechowywania od 3 do 15 °C. Walidacji modelu Ratkowsky`ego dokonano poprzez wyliczenie współczynników B_f i A_f. Stwierdzono poprawność między wartościami obserwowanymi i prognozowanymi w CP, a uzyskanymi podczas modelowania drugorzędowego (model Ratkowsky`ego).

W wyniku walidacji modeli wykazano, że prognozy wygenerowane w CP umożliwiają przewidywanie wzrostu liczby komórek *Listeria* podczas produkcji i dystrybucji cottage cheese w szerokim zakresie temperatur. Program CP w oparciu o wykonaną walidację może być zatem przydatnym narzędziem w szacowaniu ryzyka mikrobiologicznego. W pracy badawczej przedstawiono również wyniki i prognozy skutków nieprawidłowo przeprowadzonego procesu technologicznego, w wyniku którego nastąpiła zmiana pH i analogicznie zawartości kwasu mlekowego. Wyznacznikiem stabilności mikrobiologicznej jest czas trwania lagfazy. Na podstawie oszacowanych wyników uzyskanych w programie CP zaobserwowano, że w przypadku reinfekcji *L. monocytogenes* (np. podczas dystrybucji i przzerwania łańcucha chłodniczego) w temperaturze 6, 10 i 14°C czas stabilności mikrobiologicznej był dłuższy przy niższym pH i wyższej zawartości kwasu mlekowego. Najdłuższy czas stabilności mikrobiologicznej dotyczył parametrów produktu w temperaturze 6°C o wartości pH 5,2 i zawartości kwasu mlekowego 0,6 %, najkrótszy zaś w temperaturze 14 °C przy pH 5,8 i zawartości kwasu mlekowego 0,4 %. Po tym czasie według programu CP nastąpiła faza logarytmicznego wzrostu.

Stwierdzono, że środowisko cottage cheese stanowiło dobre warunki dla rozwoju pałeczek *Listeria monocytogenes* w zakresie temperatur od 3 do 15 °C, a Program CP po walidacji w oparciu o dane eksperymentalne może być ważnym narzędziem w zapewnianiu bezpieczeństwa produkcji żywności.

Przedstawione wyniki opisano w publikacji:

1. **Kowalik J.**, Tarczyńska A.S., Łobacz A. 2013. *Prognozowanie wzrostu liczby komórek Listeria monocytogenes w serku wiejskim*, Żywność, Nauka, Technologia, Jakość, , 4 (89), 37 – 48. (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IB: 2)

Etap 3.

Wyniki badań na etapie 2 stały się przesłanką do kolejnych badań. Były to badania zmierzające do opracowania uproszczonych i krótszych w czasie ilościowych analiz mikrobiologicznych. Na potrzeby badawcze wykorzystano, opracowaną selektywną pożywkę i dostosowano 2 urządzenia impedymetryczne: Bactrac i Bactometer (bioMérieux, Sy-Lab).

Do tej pory stosunkowo niewiele badań dotyczyło zastosowania odpowiednio zmodyfikowanych pożywek do ilościowego oznaczania pałeczek np. *Listeria monocytogenes* w tego typu urządzeniach, ponadto brak było możliwości ich szybkiego ilościowego oznaczania, a jest to bardzo ważny drobnoustrój z punktu widzenia prawa żywnościowego i bezpieczeństwa konsumenta.

W wykrywaniu obecności patogenów, oprócz klasycznej metody płytkowej, zastosowanie mogą mieć metody alternatywne wykorzystujące zmianę właściwości cech fizykochemicznych i biologicznych środowiska w przypadku rozwoju mikroorganizmów. Do metod takich należą: turbidymetryczne, metody filtracyjne, immunologiczne oraz wykorzystujące pomiar aktywności metabolicznej (impedymetria). Metoda impedymetryczna (wykorzystująca zmianę właściwości elektrycznych podłoża) pozwala na wykrycie obecności oraz co najważniejsze liczby (po wykonaniu modyfikacji metodycznej) komórek mikroorganizmów w produkcie spożywczym. Mikroorganizmy podczas namnażania powodują zmiany przewodności elektrycznej układu (pożywka wraz z mikroorganizmami), przekształcając polisacharydy, białka i tłuszcze do dobrze dysocjujących związków, takich jak: kwasy organiczne, aminokwasy i kwasy tłuszczowe. W miarę gromadzenia produktów metabolizmu następuje obniżenie oporu w czasie przepływu prądu elektrycznego pomiędzy elektrodami zanurzonymi w hodowli mikroorganizmów. Rejestrowane jest to przez instrument pomiarowy, który po wykalibrowaniu (analiza regresji liniowej) w odniesieniu do klasycznej metody płytkowej staje się narzędziem szybkich analiz mikrobiologicznych.

Na tym etapie badań za pomocą przystosowanych urządzeń impedymetrycznych określono i wyliczono parametry tempa wzrostu [μ] liczby komórek *Listeria monocytogenes* w serze typu mozzarella i feta podczas przechowywania w zakresie temperatur od 3 do 21 (i 37 °C w przypadku sera mozzarella), a także zbadano możliwości przystosowania metody impedymetrycznej do szybkiej mikrobiologicznej analizy ilościowej, przydatnej w mikrobiologii prognostycznej.

W celu określania liczby komórek *Listeria monocytogenes* w produkcie, dokonano kalibracji Bactometru w odniesieniu do klasycznej metody płytkowej. W metodzie płytkowej użyto podłoża Chromocult Agar (Merck) wg Ottaviani i Agosti (wg ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004) zaś w systemie impedymetrycznym eksperymentalnie zmodyfikowano pożywkę BHI ((ang. Brain Heart Infusion) (bioMérieux)). Pożywkę wzbogacono o dodatek selektywny Frasera (Merck) zawierający akryflawinę i kwas nalidiksowy (inhibitory wzrostu innych gatunków drobnoustrójów), oraz dodatek wzbogacający z cytrynianem żelazowo-amonowym (Merck) (stymulujący wzrost liczby komórek *Listeria*). W celu sprawdzenia selektywności zmodyfikowanej pożywki, przebadano próbki sera nie zanieczyszczonego pałeczkami *L. monocytogenes*. Próbkę sera przed kalibracją badano na obecność *Listeria monocytogenes*, zgodnie z normą ISO 11290-2: 1998.

Na podstawie analiz wykonanych za pomocą Bactometru nie wykryto zmian w impedancji podłoża co wskazywało na właściwie dobrany, nowatorski skład pożywki.

Rezultaty otrzymane w wyniku badań własnych wprowadzono do aplikacji ComBase DMFit. Wygenerowano modele prognostyczne oraz parametry charakteryzujące wzrost *L. monocytogenes* (μ , lag faza, czas generacji GT (ang. Generation Time), maksymalny poziom populacji). Uzyskane modele porównano z modelami wygenerowanymi w programie CP. Program CP generował prognozy na podstawie wyników badań pochodzących z zanieczyszczonych *Listeria* zmodyfikowanych pożywek (z uwzględnieniem pH, zawartości NaCl), o składzie podobnym do parametrów fizykochemicznych sera typu mozzarella użytego w badaniach.

Wykorzystanie tego typu aplikacji pozwalało na porównanie wygenerowanych modeli prognostycznych w CP z wynikami uzyskanymi w badaniach na produktach spożywczych. Wyniki badań pozyskane podczas przechowywania próbek sera mozzarella zanieczyszczonych *Listeria monocytogenes* oraz uzyskane prognozy w ComBase DMFit są zbliżone do prognoz wygenerowanych w CP w zakresie danych eksperymentalnych od 3 do 37°C. Program CP może być wykorzystywany podczas wspierania szacowania ryzyka mikrobiologicznego dla produktów o podobnych parametrach fizykochemicznych jak użyty w badaniach ser typu mozzarella.

Kolejnym aspektem badawczym była analiza zachowania łaseczek *Bacillus cereus* w serze typu feta i mozzarella podczas przechowywania w zakresie temperatur od 3 do 15°C z zastosowaniem impedymetrycznego systemu Bactrac. W celu określania liczby komórek *Bacillus cereus* w serach feta i mozzarella dokonano kalibracji urządzenia w odniesieniu do klasycznej metody płytkowej (z wybiórczym podłożem Mossela MYP (Merck) oraz z wykorzystaniem próbek z elektrodami i bulionem z dodatkiem selektywnym Bimedia 610 (SyLab). Uzyskane wyniki analiz w systemie Bactrac z szeregu kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń (w postaci czasu detekcji DT (ang. Detection Time)) wprowadzono do arkusza kalibracyjnego w oprogramowaniu obsługującym urządzenie. Zdefiniowano funkcję regresji liniowej oraz wprowadzono wartości liczbowe jtk odczytane w metodzie płytkowej. W dalszym etapie pracy urządzenie wykorzystano do określania liczby komórek *Bacillus cereus* w trakcie przechowywania celowo zanieczyszczonych próbek (*inoculum* - log 3 jtk/g) serów typu feta i mozzarella podczas ich przechowywania do 4 tygodni (w zależności od temperatury).

Wyniki analiz posłużyły do modelowania matematycznego w podobny sposób jak w przypadku pałeczek *Listeria*, wykorzystując program ComBase DMFit i CP.

Zaobserwowano różnice między modelami opracowanymi na podstawie danych eksperymentalnych a tymi gotowymi, uzyskanymi w programie CP. W przypadku przechowywanego sera typu feta, faza logarytmicznego wzrostu *B. cereus* nastąpiła szybciej niż według prognoz uzyskanych w CP w każdej temperaturze przechowywania. Świadczył o tym również wyliczony w ComBase DMFit czas trwania lag fazy dla danych eksperymentalnych i tych uzyskanych z programu CP. Prognozy wzrostu *B. cereus* wygenerowane przez program CP stwarzały zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności mimo ustawienia wartości pH wyższej niż w produkcji (niższe pH hamuje rozwój drobnoustrojów). W temperaturze 15°C w zakresie danych eksperymentalnych (ComBase DMFit) nie

zaobserwowano lag fazy a faza logarytmicznego wzrostu nastąpiła w bardzo krótkim czasie po zanieczyszczeniu produktu.

W przypadku badań z użyciem sera typu mozzarella, prognozy wygenerowane w programie CP zapewniały margines bezpieczeństwa, szczególnie w temperaturze 9, 12 i 15 °C. W badaniach do tego etapu pracy maksymalne tempo wzrostu (μ) dla *B. cereus* w temperaturze 15°C wynosiło: dla sera feta 0,022 log a dla mozzarella 0,026 log jtk/g/h. W celu walidacji uzyskanych modeli wzrostu *Bacillus cereus* w serze typu feta i mozzarella porównano współczynnik μ na wykresie równości. Jest to walidacja graficzna modeli pierwszorzędowych poprzez porównanie obserwowanego (ComBase DMFit – badania własne) i prognozowanego (CP) tempa wzrostu μ . Punkty leżące powyżej linii równości stanowią o wysokim marginesie bezpieczeństwa prognoz uzyskanych w programie CP, zaś poniżej tej linii, świadczą o możliwości szybszego namnażania się *B. cereus* w badanych produktach niż przewidywał CP. Tempo wzrostu *Bacillus cereus* w przypadku sera typu feta w zakresie temperatur od 3 do 15 °C charakteryzowało się podobną wartością (pomiędzy 0,017 a 0,021 log/jtk/g/h) zaś wartości uzyskane w CP wzrastały wraz ze wzrostem temperatury (od 0,009 do 0,040 log/jtk/g/h). W przypadku sera typu mozzarella wartości μ wyniosły od 0,019 do 0,026 log/jtk/g/h, a prognozowane w CP od 0,017 do 0,087 log/jtk/g/h. Optymalną temperaturą wzrostu wegetatywnych form laseczek *B. cereus* jest zakres od 30 do 40 °C, stąd też wartości μ uzyskane podczas doświadczenia nie wykazywały dużej różnicy.

Przedstawione wyniki opisano w publikacjach:

1. **Kowalik J.**, Adamczewski K., Ziajka S. 2014. *Szacowanie wzrostu liczby komórek Listeria monocytogenes z wykorzystaniem urządzenia impedymetrycznego w serze mozzarella*. Żywność, Nauka, Technologia, Jakość, 1 (92), 66-77 (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IB: 3).
2. **Kowalik J.**, Łobacz A, Adamczewski K., Tarczyńska A.S. 2014. *Zastosowanie alternatywnych metod oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego wybranych serów*. Żywność, Nauka, Technologia, Jakość, 5 (96), 134 – 143 (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IB: 4).

Etap 4

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu różnej zawartości tłuszczu w produktach mleczarskich na wzrost liczby pałeczek *Listeria monocytogenes* a także konstrukcja i walidacja o wyniki zewnętrzne modeli matematycznych pierwszorzędowych. W badaniach użyto produkty poddane wysokiej obróbce termicznej (ang. Ultra High Temperature, UHT): mleko o zaw. 2% tłuszczu. oraz śmietanka o zaw. 12 i 30% tłuszczu. Próbkę zanieczyszczono szczepami *Listeria* wyizolowanymi z żywności i opisanymi jako *Listeria monocytogenes* 3 i 38. Pochodziły one z kolekcji szczepów Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie.

Ważnym aspektem podjętych badań było to, że większość dostępnych modeli prognostycznych uwzględnia takie parametry środowiska jak: pH, aktywność wody, zawartość NaCl zaś brak było opisu wpływu zawartości tłuszczu. Próbkę produktów zanieczyszczono hodowlą *Listeria monocytogenes* na poziomie ok. log 3 jtk/ml

i przechowywano w temperaturze 3, 6, 9, 12 i 15°C. Produkty zbadano na obecność *Listeria* według normy PN-EN ISO 11290-2:2000 z wykorzystaniem bulionu Frasera. Liczbę komórek *Listeria monocytogenes* w przechowywanych próbkach określano za pomocą klasycznej metody płytkowej z wykorzystaniem selektywnego podłoża wg Ottaviani i Agosti (Merck). Próbkę badano, aż do osiągnięcia maksymalnej liczby populacji w poszczególnych temperaturach. Uzyskane wyniki poddano modelowaniu pierwszorzędowemu (model Baranyi, zmodyfikowana funkcja Gompertza i funkcja logistyczna). Dokładność dopasowania modeli pierwszorzędowych analizowano poprzez obliczenie błędu MSE i kryterium informacyjnego Akaike (AIC – Akaike Information Criterion). Najlepiej dopasowanym modelem okazał się model Baranyi i Roberts'a, który posłużył do dalszych badań i modelowania drugorzędowego.

Za pomocą analizy wariancji sprawdzono czy zawartość tłuszczu istotnie ($p < 0,05$), wpływała na zachowanie *L. monocytogenes*. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w zachowaniu patogenu.

Następnie skonstruowano modele drugorzędowe wykorzystując równania: Arrheniusa, Ratkowskiego i wielomiany. Modele wielomianowe najlepiej opisywały zmiany tempa wzrostu (μ) *Listeria* podczas zmiany temperatury przechowywania produktów ($R^2=0,94$). Walidacji modeli drugorzędowych dokonano poprzez wyliczenie współczynników A_f i B_f . Współczynniki A_f (1,177) oraz B_f (1,027) dla modelu wielomianowego były najbardziej bliskie wartości 1, co świadczyło o jego dobrym dopasowaniu.

Zastosowanie modeli prognostycznych do wspomagania narzędzi zapewniania bezpieczeństwa żywności zależy od dobrze przeprowadzonego procesu walidacji tych modeli. W tym celu oprócz obliczenia współczynników A_f i B_f modele poddano walidacji matematycznej na podstawie danych zewnętrznych pochodzących z bazy ComBase i symulacji w ComBase Predictor. Na podstawie symulacji w ComBase Predictor dla zadanych parametrów fizykochemicznych odzwierciedlających środowisko produktów UHT, oraz dla wyników innych badaczy znalezionych w bazie ComBase wyliczono współczynniki A_f (1,159 dla ComBase i 1,510 dla CP) i B_f (1,021 dla ComBase i 1,185 dla CP). Aplikacja CP precyzyjnie określała zachowanie patogenu w produktach UHT.

Większość trzeciorzędowych modeli działa w oparciu o dane mikrobiologiczne generowane na pożywkach płynnych o znanym i łatwo modyfikowalnym składzie chemicznym. Są to tak zwane modele "bezpieczne", które mają szeroki margines bezpieczeństwa. Generowane przez modele prognozy obciążone są często istotnym błędem. Dlatego też coraz bardziej powszechne i bardziej skuteczne są modele uzyskane na podstawie danych pochodzących bezpośrednio z żywności.

Podsumowując powyższy etap badań, stwierdzono, że utworzone modele dla produktów mlecznych UHT dokładnie prognozują wzrost liczby komórek *L. monocytogenes* w zakresie temperatur od 3 do 15°C. Opracowane modele mogą być narzędziem wykorzystywanym w analizie zagrożeń w trakcie wdrażania systemu HACCP, szacowania narażenia w procesie oceny ryzyka mikrobiologicznego, wspierając decyzje w wielu aspektach mikrobiologii żywności i zarządzania jej bezpieczeństwem.

W badaniach nad rozwojem modeli prognostycznych określono zachowanie pałeczek *Yersinia enterocolitica* w serze typu camembert podczas przechowywania w zakresie temperatur od 3 do 15°C. *Yersinia enterocolitica* jest ważnym czynnikiem

etiologicznym w zatruciach odżywnościowych. Pałeczki te powodują ostre zapalenie żołądka i jelit oraz zapalenie węzłów chłonnych, na które narażone są głównie dzieci. *Yersinia* podobnie jak *Listeria* zachowuje swoją żywotność podczas przechowywania żywności w warunkach chłodniczych (nawet 0°C). Należy podkreślić, że w produkcji mleczarskiej, zagrożenia mikrobiologiczne występują najczęściej wskutek wtórnego zanieczyszczenia produktu, w wyniku błędów w procesach technologicznych co umożliwia wzrost liczby komórek patogenów w trakcie przechowywania i dystrybucji. W literaturze niewiele jest opracowanych modeli wzrostu dla pałeczek *Yersinia*. W ostatnich latach w Polsce, wzrosło spożycie serów pleśniowych. Badania mikrobiologiczne serów określone są w kryteriach mikrobiologicznych zawartych w Rozporządzeniu Komisji Europejskiej nr 2073/2005, w których analizy skoncentrowane są głównie na określaniu obecności i liczby pałeczek *Listeria*, brak jest konieczności badań żywności pod kątem *Yersinia*, a jest to również drobnoustrój psychrotrofowy. Technicznie *Yersinia* jest trudniejsza do określania w żywności ze względu na brak rutynowych badań. Na tym etapie skonstruowano modele prognostyczne dotyczące wzrostu liczby komórek *Yersinia enterocolitica* (3 szczepy referencyjne ATCC9610, ATCC23715 oraz ATCC27729, (Microbiologics) w serze pleśniowym typu camembert (ser pozyskany z zakładu mleczarskiego Hochland Polska Sp. z o.o., Baranowo). Do określania liczby komórek bakterii w zanieczyszczonych celowo próbkach (poziom początkowy ok. log 2 jtk/ g) wykorzystano podłoże Agar CIN z selektywnym dodatkiem według Schiemanna (Merck-Millipore). Parametry fizykochemiczne sera wynosiły: pH 5,1; kwasowość miareczkowa 30°SH (0,67% kwasu mlekowego), zawartość NaCl 2%. Badania prowadzono do osiągnięcia maksymalnej liczby populacji. Próbkę sera przed zanieczyszczeniem zbadano na obecność *Yersinia* 3-stopniową metodą wykrywania wg ISO 10273:2003. Próbkę nie zawierały komórek *Yersinia*. Następnie dokonano modelowania pierwszorzędowego z wykorzystaniem modelu czteroparametrycznego sigmoidalnego Gomperta oraz Baranyi i Roberts'a. Do modelowania drugorzędowego użyto równanie pierwiastka kwadratowego opisanego przez Ratkowsky'ego. Poprawość prognoz modeli pierwszo- i drugorzędowych obliczono za pomocą określenia błędu MSE i kryterium Akaike (AIC). Według AIC im niższa wartość tego parametru tym lepsza poprawność prognoz. Model Gomperta wykazywał niższą wartość AIC i MSE dla temperatury 3, 6, 9, 12 i 15°C w porównaniu do modelu Baranyi i Roberts'a. Model Gomperta był na poziomie satysfakcjonującym w 80%.

Modelowanie drugorzędowe umożliwiło określenie zależności maksymalnego specyficznego tempa wzrostu μ (log jtk/g) (GR) oraz czas trwania lagfazy (LT) pałeczek *Yersinia* w zależności od temperatury przechowywania (dla każdej temperatury 3, 6, 9, 12 i 15°C). LT i GR obliczono na podstawie modelowania pierwszorzędowego z wykorzystaniem modelu Baranyi i Roberts'a oraz funkcji Gomperta.

Wykonano walidację modeli drugorzędowych z wykorzystaniem obliczonych współczynników: determinacji (R^2) oraz A_f i B_f . Współczynnik determinacji R^2 wyliczony dla GR i LT wynosił 0,89 i 0,70 (funkcja Gomperta) oraz 0,88 i 0,75 (model Baranyi i Roberts'a) co świadczyło o zadowalającym dopasowaniu modelu.

Podobnie jak w opisanych wcześniej badaniach dokonano walidacji modeli o dane zewnętrzne pochodzące z aplikacji CP (modele na podstawie danych z badań na pożywkach i bazy ComBase (dane z badań na konkretnych produktach spożywczych).

W CP po wpisaniu parametrów fizykochemicznych sera camembert otrzymano wyższe wartości GR co prawdopodobnie wynika z faktu, że w serze camembert występuje mikroflora towarzysząca spowalniająca tempo wzrostu *Yersinia*. Wartości A_f i B_f podczas walidacji modelu pierwiastka kwadratowego zbudowanego na podstawie modeli: Gompertza (odpowiednio 1,47 i 1,16) oraz Baranyi i Roberts'a (1,46 i 1,15) były zbliżone. Wartość B_f (1,16) dla modelu Gompertza była według danych literaturowych na granicy akceptowalności (prawidłowy zakres 1,05-1,15). Następnie dokonano walidacji wygenerowanego modelu pierwiastka kwadratowego w oparciu o niezależne dane z bazy ComBase. Walidację graficzną wykonano z wykorzystaniem linii równości, gdzie porównano wartości GR wyliczone z badań własnych i GR wyliczone na podstawie danych z bazy ComBase. Walidacja dała satysfakcjonujące rezultaty, ponieważ obserwowane GR (badania własne) i prognozowane GR (uzyskane z niezależnych badań) umiejscowione były w pobliżu linii równości.

Stwierdzono, że model pierwiastka kwadratowego uzyskany na podstawie modeli Baranyi i Roberts'a oraz Gompertza poprawnie opisywały parametry wzrostu (GR i LT) w zależności od temperatury przechowywania sera typu camembert, co w przypadku reinfekcji produktu pałeczkami *Yersinia* daje możliwości określania ryzyka dla zdrowia konsumenta.

Przedstawione powyżej wyniki opisano w publikacjach:

1. **Kowalik J., Łobacz A.** 2015. *Development of a predictive model describing the growth of Yersinia enterocolitica in camembert- type cheese.* International Journal of Food Science and Technology, 50, 811–818 (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IB: 5).
2. Łobacz A., **Kowalik J.,** 2015. *A predictive model for Listeria monocytogenes in UHT dairy products with various fat content during cold storage.* Journal of Food Safety, 35, 119–127 (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IB: 6).

4. Podsumowanie – aspekt aplikacyjny

Na podstawie przeprowadzonych analiz dostępne bazy danych zawierające modele prognostyczne wzrostu różnych patogenów w produktach charakteryzujących skład fizykochemiczny produktów mleczarskich są znaczącym źródłem informacji o ich zachowaniu na różnych etapach procesów produkcyjnych i podczas dystrybucji.

W celu naukowego potwierdzenia, że w produkcji spożywczym nie rozwiną się drobnoustroje niepożądane, przeprowadzono badania przechowalnicze w szerokim zakresie temperatur. Elementy mikrobiologii prognostycznej zastosowano w analizie uzyskanych wyników badań laboratoryjnych (próbki celowo zanieczyszczone określonymi patogenami). Mikrobiologia prognostyczna i uzyskane modele matematyczne mogą posłużyć do opisu zachowania mikroorganizmów w żywności. Właściwie walidowane modele mogą być użyte do ilościowego szacowania ryzyka mikrobiologicznego w czasie rzeczywistym. Istnieje również potrzeba tworzenia programów prognostycznych w oparciu o dane eksperymentalne pochodzące z badań nad rozwojem patogenów i bakterii niepożądanych w gotowych produktach spożywczych.

Prognozowanie mikrobiologiczne stanowi nowe, naukowe podejście do oszacowania ilościowego i jakościowego ryzyka mikrobiologicznego w łańcuchu dystrybucyjnym produktów spożywczych (w tym mleczarskich).

Alternatywne metody pomiaru (zastosowane w niniejszych badaniach) liczby komórek wykorzystujące zjawisko impedymetrii po wykalibrowaniu urządzenia i zmodyfikowaniu pożywki mogą być przydatne do szybkiego, selektywnego i ilościowego określania bakterii *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* w różnych produktach mleczarskich.

Opracowane i zwalidowane modele prognostyczne rozwoju bakterii z gatunku: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* i *Yersinia enterocolitica* dla różnych produktów mleczarskich (płynnych i stałych) w szerokim zakresie temperatur są wartościowym narzędziem wspierającym działanie systemów zarządzania mikrobiologicznym bezpieczeństwem żywności. Modele prognostyczne opracowane dla konkretnych produktów spożywczych pozwalają w krótkim czasie oszacować stan mikrobiologiczny żywności co daje możliwość podjęcia decyzji (w przypadku stwierdzenia niezgodności) o wycofaniu produktu z rynku lub, skrócenia terminu przydatności do spożycia. Modele matematyczne mogą być również skutecznym narzędziem do szacowania przyczyn i skutków nieprawidłowo przeprowadzonego procesu produkcyjnego, jak również pomocne w dialogu oraz znalezieniu wspólnego mianownika w kwestiach dotyczących zagrożeń mikrobiologicznych produkowanej żywności. Ponadto mogą przyczynić się do analizowania skutków w przypadku zatruc pokarmowych, możliwości znalezienia, udowodnienia i ustalenia przyczyn nie tylko podczas analizy jakościowej ale przede wszystkim ilościowej.

Szczegółowa, tradycyjna kontrola żywności, pod względem jakości mikrobiologicznej, jest w dużej mierze czasochłonna, pracochłonna, a wyniki badań mikrobiologicznych uzyskuje się po zakończeniu procesu. Ponadto, badania przeprowadzane na dużą skalę są kosztowne.

Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej do opracowanych i zwalidowanych modeli umożliwiło wykreowanie narzędzia pozwalającego przewidywać stan bezpieczeństwa gotowego wyrobu na poszczególnych etapach łańcucha żywnościowego.

Wyniki prowadzonych prac naukowo-badawczych (wchodzących w skład osiągnięcia naukowego) przedstawiłem na 8 konferencjach/sympozjach międzynarodowych. Podczas tych spotkań prezentowałem postery (9) lub głosiłem referaty (3), łącznie 12.

Przedstawione badania we wskazanym osiągnięciu (5 publikacji z ostatnich 3 lat) zostały zauważone na arenie międzynarodowej i zarejestrowane jako cytowania w bazach: Web of Science (1 cyt.), Scopus (3 cyt.) i Google Scholar (6 cyt.). Cytowania pochodzą m.in. od autorów z czasopism: Journal of Food Processing and Preservation i European Food Research and Technology. W bazie Research Gate powyższe publikacje były czytane przez 283 zalogowanych użytkowników (dane z 16. marca 2016 r.).

5. Literatura:

1. Gorris L. G. M. 2005. Food safety objective: An integral part of food chain management. Food Control, 16: 801-809.
2. Kajak K.: Zasady prognozowania w mikrobiologii żywności. 2001. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 27: 81-93.

3. Kołożyn–Krajewska D., Jałosińska–Pieńkowska M. 2003. Prognozowanie mikrobiologiczne jako narzędzie kształtowania bezpieczeństwa żywności. *Przemysł Spożywczy*. 2: 32-34, 48.
4. Łobacz A., Kowalik J., Tarczyńska A.S. 2013. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in mould cheeses. *Journal of Dairy Science*. 96(6): 3449-3460.
5. Łobacz A., Kowalik J., Ziajka S., Kopeć M. 2008. Porównanie i walidacja prognozowanego i obserwowanego tempa wzrostu *Listeria monocytogenes* w mleku pasteryzowanym i UHT. *Medycyna Weterynaryjna*. 64: 80-84.
6. Mc Kellar R. C., Lu X. W. 2004. Modeling microbial responses in foods. CRC Press LLC, Florida.
7. McMeekin T. A., Baranyi J., Bowman J., Dalgaard P., Kirk M., Ross T., Schmid S., Zwietering M. H. 2006. Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology*. 112: 181-194.
8. McMeekin T. A., Ross T. 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*. 78: 133-153.
9. Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. *Dz. Urz. L* 31 z 1.2.2002.
10. Scott V. N. 2005. How does industry validate elements of HACCP plans? *Food Control*. 16: 497-503.
11. Tarczyńska A.S., Kowalik J., Łobacz A. 2012. Modelowanie mikrobiologicznego bezpieczeństwa żywności. *Przemysł Spożywczy*. 6: 35-38.
12. Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia z dnia 25 sierpnia 2006 r., *Dz. U.* 2006 r. nr 171, poz. 1225.

V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Po zakończeniu edukacji na poziomie szkoły średniej (Technikum Przemysłu Spożywczego, specjalność technologia mleczarska przy Zespole Szkół Zawodowych we Włoszczowie) i uzyskaniu indeksu na studia (jako laureat Olimpiady na szczeblu ogólnopolskim – Ogólnopolski Turniej Wiedzy o Mleku i Mleczarstwie, Wysokie Mazowieckie 1997 organizowanym przez Wydział Technologii Żywności ówczesnej Akademii Rolniczo-Technicznych w Olsztynie) rozpocząłem jednolite studia magisterskie na Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie (aktualnie Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie). W 2002 roku obroniłem pracę magisterską przygotowaną w Instytucie Rozwoju Mleczarstwa Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie uzyskując tytuł zawodowy magistra inżyniera technologii żywności i żywienia człowieka w zakresie technologii mleczarskiej. W tym samym roku podjąłem studia doktoranckie na Wydziale Nauki o Żywności, realizując pracę doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Stefana Ziajki. Z dniem 1. grudnia 2006 roku zostałem zatrudniony na stanowisku technologa. W dniu 28 czerwca 2007 roku obroniłem

z wyróżnieniem Rady Wydziału Nauki o Żywności dysertację doktorską nt: *Badania nad szacowaniem ryzyka mikrobiologicznego produktów mleczarskich*, otrzymując, decyzją Rady Wydziału, stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia (mikrobiologia mleczarska).

Od 1 września 2007 roku zostałem zatrudniony na stanowisku specjalisty, a od 1. listopada 2008 roku pracuję jako adiunkt w Katedrze Mleczarstwa i Zarządzania Jakością Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie.

Kierunki mojej pracy badawczej stanowią kompilację własnych zainteresowań naukowych, bieżących trendów i problemów związanych z zagrożeniami mikrobiologicznymi ale i nowymi rozwiązaniami w technologii żywności (głównie mleczarskiej).

Biorąc pod uwagę tematykę badań oraz kompleksowość i różnorodność metod badawczych prace naukowo-badawcze realizowałem głównie w zespołach badawczych.

Realizowane przeze mnie badania skupiają się wokół następujących zagadnień:

- A) Określanie wpływu czynników środowiska produktów mleczarskich na rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych i prognozowanie ich zachowania podczas przechowywania w szerokim zakresie temperatury,
- B) Systemy zarządzania bezpieczeństwem żywności,
- C) Żywność funkcjonalna, wybrane aspekty,
- D) Technologia pozyskiwania nowych produktów mleczarskich na bazie produktów rozdziału membranowego mleka, ich charakterystyka i akceptowalność przez konsumenta.

A) Określanie wpływu czynników środowiska produktów mleczarskich na rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych i prognozowanie ich zachowania podczas przechowywania w szerokim zakresie temperatury

Oprócz badań wyeksponowanych we wskazanych publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego przeprowadzono jeszcze inne prace w zakresie tego zagadnienia.

Do określania liczby komórek mikroorganizmów i opracowywania modeli w mikrobiologii prognostycznej wykorzystane może być zjawisko impedymetrii, mogące zastąpić klasyczną metodę płytkową przy określaniu liczby bakterii w badanym produkcie.

W aspekcie tych badań podjąłem się określenia przydatności systemu monitorującego Bactometer M64 do konstrukcji modeli prognostycznych wzrostu drobnoustrojów. W badaniach wykorzystano modelowe produkty uzyskane przez modyfikację pożywki BHI (bioMerieux) stosując dodatek kwasu mlekowego, soli kuchennej i azotanu sodu. Doświadczenie wykonano z udziałem pałeczek *Escherichia coli* 22. Analizy mikrobiologiczne przeprowadzono klasyczną metodą płytkową oraz z zastosowaniem impedymetru. System impedymetryczny dostosowano do założeń badań tak, że wskazywał różnice w zachowaniu szczepu *Escherichia coli* 22 w zależności od zastosowanych dodatków. System impedymetryczny umożliwiał badanie wpływu rozmaitych czynników na wzrost liczby komórek drobnoustrojów (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IIA: 5,6; pkt. IID:3,4; pkt. IIK: 3). W zakresie wykorzystania impedymetrii do badań w mikrobiologii prognostycznej badałem również przeżywalność *Listeria monocytogenes* w mleku sterylizowanym i przechowywanym

w różnych temperaturach (od 3 do 20°C) w czasie 14 dni. Uzyskane wyniki w Bactometrze porównano z wynikami uzyskanymi za pomocą programu komputerowego Pathogen Modeling Program 7.0 (PMP70). W programie ustalono podobne warunki środowiska do tych panujących w zanieczyszczonym *Listeria* mleku. Uzyskane wyniki różniły się od tych wygenerowanych w PMP70, tzn. komórki bakterii nie osiągnęły maksymalnej liczby populacji takiej jak w programie komputerowym. Czynniki związane z żywnością (np. dostępność składników pokarmowych) nie są zazwyczaj uwzględniane w programach bazujących na pożywkach mikrobiologicznych. Omawiane wyniki wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań na produktach żywnościowych, a wykorzystując uzyskane modele w przemyśle spożywczym można szybko zmodyfikować istniejące receptury, zanim zostaną wykonane np. kosztowne badania laboratoryjne lub pilotażowe. Dostępne programy komputerowe dają możliwości oszacowania wstępnego podczas np. zmiany parametrów fizykochemicznych produktów (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IIA:4,6; pkt. IID:22; pkt. IIK: 2,5,6,9; pkt. IIIQ: 2.11).

Kontynuując badania nad wykorzystaniem systemu impedymetrycznego Bactometer M64 do zapewniania bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności wykonano kalibrację i dostosowano selektywną pożywkę mikrobiologiczną do określania ilościowego pałeczek *Listeria* w serze typu feta. W odróżnieniu od produktów UHT, w serze typu feta występuje mikroflora towarzysząca i konieczne było zastosowanie pożywki selektywnej. W celu umożliwienia szybkich analiz ilościowych, skład pożywki BHI (Brain Heart Infusion - bioMerieux) zmodyfikowano przez dodatek selektywnego suplementu Fraser (Merck) (podobnie jak modyfikacja pożywki opisana w Etapie 3, Omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, str. 14). Próbkę sera zanieczyszczono *Listeria monocytogenes*. W celu potwierdzenia, że zmodyfikowana pożywka BHI działała selektywnie wobec pałeczek *Listeria* analizowano próbki sera bez jej dodatku. Kalibracja Bactometru wykazała wysoką korelację z metodą płytkową ($R = 0,98$). System impedymetryczny po jego kalibracji na wielu produktach mleczarskich i dla różnych gatunków patogenów oraz z zastosowaniem właściwych dodatków selektywnych może być użytecznym narzędziem umożliwiającym szybkie, ilościowe analizy mikrobiologiczne. Tego typu analizy stanowią ważną kwestię w produkcji i dystrybucji bezpiecznej żywności, a także mogą znaleźć zastosowanie w mikrobiologii prognostycznej (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IID: 10; pkt. IIK: 10). Kontynuując pracę w tej tematyce zbadano przeżywalność pałeczek *Listeria monocytogenes* w mleku i śmietance UHT. Celowo zanieczyszczono próbki przechowywano w zakresie temperatur od 3 do 21 °C. Pomiaru liczby komórek *L. monocytogenes* dokonano za pomocą urządzenia Bactometer M64. Do badań wykorzystano selektywne, zmodyfikowane podłoże mikrobiologiczne BHI (bioMérieux), a urządzenie wykalibrowano w odniesieniu do klasycznej metody płytkowej. Otrzymane dane wprowadzono do aplikacji DMFit otrzymując modele pierwszorzędowe Baranyi i Roberts'a oraz parametry charakteryzujące dynamikę wzrostu *L. monocytogenes*. Wygenerowane w DMFit dane porównano z prognozami w programie ComBase Predictor (CP) oraz WaMa Predictor (WMP). Porównując uzyskane rezultaty z modelami prognostycznymi (CP i WMP) zaobserwowano margines bezpieczeństwa pozwalający na wykorzystanie tych aplikacji w szacowaniu ryzyka mikrobiologicznego (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IID:17, pkt. IIIB: 6,8,13,14,15,16,18).

W tym aspekcie badawczym prowadziłem również badania określające wzrost liczby pałeczek *Listeria monocytogenes* 38 w mleku sterylizowanym, celowo zanieczyszczonym i przechowywanym 21 dni w zakresie od 3 do 15°C. Szczep pozyskano z Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności WNoŻ, UWM. Był to szczep wyizolowany z mleka surowego. Do określania liczby *L. monocytogenes* 38 wykorzystano Bactometer M64 ze zmodyfikowaną przeze mnie pożywką. Uzyskane wyniki wzrostu liczby komórek bakterii wykorzystano do modelowania matematycznego w aplikacji DMFit (dodatek Excel-MS Office). Następnie wykorzystując wyliczone w DMFit specyficzne tempa wzrostu [μ] dokonano walidacji graficznej istniejących modeli ogólnych zawartych w programach komputerowych PMP70 i Growth Predictor (GP) bazujących na wynikach uzyskanych z modyfikowanych pożywek mikrobiologicznych. Poprawność i przydatność modeli PMP70 i GP określono również wykorzystując wybrane A_f i B_f . Walidacja wskazała na lepszą przydatność predykcyjną programu GP (Praca doktorska, Załącznik 4: Wykaz, pkt. IIA:6). Realizując badania w tym zakresie przeanalizowano i wykonano symulację różnych wariantów dotyczących zmian składu produktu i ich wpływ na bezpieczeństwo mikrobiologiczne. Przykładem może być przewidywanie bezpiecznego terminu przydatności do spożycia nowego produktu (serek twarogowy do smarowania o zawartości 2% NaCl, kwasu mlekowego 0,60 i 0,65%, pH 5,2 i 5,5 i aktywności wody 0,98). Wykorzystując program Growth Predictor lub PMP70 oszacowano możliwe zagrożenie mikrobiologiczne dla tego produktu w wyniku zanieczyszczenia bakteriami z gatunku *Yersinia enterocolitica* oraz *Listeria monocytogenes*. Występowanie tych pałeczek w produkcji może być wynikiem nieprawidłowo przeprowadzonego procesu technologicznego lub reinfekcji. Wykorzystując wspomniane programy możemy określić zachowanie tych mikroorganizmów (np. tempo wzrostu, czas lagfazy) podczas przechowywania produktu w warunkach chłodniczych (ustawiając w nich parametry: *inoculum*, czas i temperatura przechowywania a także aktywność wody i zawartość kwasu mlekowego). W wygenerowanych modelach zaobserwowano, że temperatura, pH i zawartość kwasu mlekowego podczas przechowywania produktu miały istotny wpływ na tempo wzrostu wybranych do analizy bakterii. Oprócz temperatury przechowywania istotne do oceny bezpieczeństwa żywności jest również przestrzeganie innych parametrów produkcji i ustalenie właściwych poziomów docelowych i granic krytycznych podczas monitorowania parametrów procesu. W tym przypadku rozpatrywano tylko dwie wartości pH, dwa poziomy kwasu mlekowego, jedną zawartość NaCl oraz niewielką liczbę bakterii na poziomie początkowym (ok. 100 jtk/g). W celu określenia bezpiecznego okresu przechowywania ważne jest oszacowanie właściwych parametrów produktu t.j.: pH, zawartość NaCl, kwasu mlekowego. Dobrze opracowane modele prognostyczne pozwalają określić bezpieczną (pod względem mikrobiologicznym) technologię produkcji, zaś w sytuacjach awaryjnych (np. długotrwała awaria chłodni, lub jej przeładowanie) dają niezbędne informacje o stanie mikrobiologicznym produktu (Praca doktorska, Załącznik 4: Wykaz, pkt IIA: 1,2; pkt IID: 1,4,5,24; pkt IIK: 1; pkt. IIIQ: 2.8).

W ramach tej tematyki badawczej określano też zachowanie pałeczek *Listeria monocytogenes* 38 w serze twarogowym podczas 21 dni przechowywania w zakresie temperatury od 3 do 15°C. Oznaczenia mikrobiologiczne wykonano klasyczną metodą płytkową z zastosowaniem podłoża Agar Oxford wraz z wybiórczym dodatkiem Oxford *Listeria* (Merck). Zachowanie *Listeria monocytogenes* 38 w badanym twarogu przedstawiono

w postaci modeli wygenerowanych w aplikacji DMFit (równanie Baranyi) oraz modelu zbiorczego czasowo-temperaturowego (wielomian stopnia drugiego). Wyniki analiz porównano graficznie z prognozami otrzymanymi z programu GP. W programie GP ustalono parametry, symulujące zachowanie się pałeczek *Listeria* w warunkach panujących w twarogu wprowadzając wartości pH wynikające z oznaczeń podczas badań. Zawartość kwasu mlekowego ustalono na poziomie 7900 ppm, aktywność wody charakterystyczna dla tej grupy produktów 0,98 oraz temperatury zgodne z zastosowanymi w badaniach. Oznaczenia pH w przechowywanym twarogu nie wykazywały istotnych statystycznie zmian, więc wartości w programie GP ustawiono: dla 3 i 6°C jako 4,6 zaś dla wyższej temperatury jako 4,5. Poziom początkowy *Listeria monocytogenes* ustalono na ok. 3 log jtk/g. Wykazano, że wyniki badań w twarogu różnią się od tych uzyskanych na pożywkach mikrobiologicznych w oparciu, o które bazuje GP. Stwierdzono że, aby modele prognostyczne dawały najbardziej rzeczywiste prognozy, które mogą być przydatne w kreowaniu jakości mikrobiologicznej produktów powinny być opracowywane dla każdego rodzaju żywności (Praca doktorska, Załącznik 4: Wykaz, pkt. IID: 7, 8; pkt. IIK:8; pkt. IIIQ: 2.3).

W szeregu prac przedstawiłem również możliwości zastosowania mikrobiologii prognostycznej podczas dojrzewania i przechowywania serów pleśniowych (z porostem (typu camembert) i przerostem pleśni (typu blue cheese)). Na tym etapie badań określano zachowanie pałeczek *Listeria monocytogenes* w zakresie temperatur od 3 do 15°C. Próbkę serów zanieczyszczono pałeczkami na poziomie ok. log 3 jtk/g. Uzyskane krzywe wzrostu patogenu wykorzystano do modelowania pierwszorzędowego z wykorzystaniem równania Baranyi i Roberts'a oraz zmodyfikowanej funkcji sigmoidalnej Gompertza. Model Baranyi i Roberts'a wskazywał na lepsze prognozy (kryterium AIC i błąd MSE) i posłużył do modelowania drugorzędowego. W modelowaniu drugorzędowym wykorzystano model pierwiastka kwadratowego według Ratkowsky'ego oraz modele wielomianowe. Parametry modelu wielomianowego wskazywały dokładniejsze prognozy dotyczące wpływu temperatury przechowywania na tempo wzrostu *Listeria* osiągając współczynnik determinacji 0,97 i 0,92 (odpowiednio dla sera z porostem i przerostem pleśni). Uzyskane współczynniki tempa wzrostu *L. monocytogenes* w serach pleśniowych porównano z symulacjami programu PMP70 i ComBase Predictor (CP). Prognozy uzyskane z CP były znacznie przeszacowane i zawierają duży poziom błędów. Ponadto przeprowadzono proces walidacji modeli z wykorzystaniem niezależnych danych z bazy ComBase. W rezultacie, stwierdzono, że liczba komórek *L. monocytogenes* rośnie znacznie szybciej w serze typu camembert niż typu „blue cheese”. Obydwa modele Baranyi i Gompertza dokładnie opisywały zachowanie *Listeria* w badanych serach, lecz model Baranyi obarczony był mniejszym błędem. Modele drugorzędowe po walidacji (opisujące wpływ zmian temperatury przechowywania na tempo wzrostu) można wykorzystać do określania zachowania tego patogenu w produktach o podobnym składzie (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IIA: 7).

W celu zapewnienia bezpieczeństwa produktów spożywczych należy zastosować wszechstronne i zintegrowane podejście do procesu produkcji. Ponadto, zapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego żywności jest jednym z celów polityki żywnościowej, któremu przypisuje się istotne znaczenie w ochronie zdrowia publicznego. Według Rozporządzenia WE 178/2002 bezpieczeństwo żywności oznacza brak szkodliwych następstw dla zdrowia wywołanych przez żywność, przy założeniu, że jej przygotowanie i spożycie nastąpiło

zgodnie z przeznaczeniem. Wymagania dotyczące jakości mikrobiologicznej stawiane produktom spożywczym definiuje Rozporządzenie WE nr 2073/2005, wraz z późniejszymi zmianami (1441/2007 i 365/2010). Kontynuując to zagadnienie w pracy badawczej przeanalizowałem jakość mikrobiologiczną wybranych serów dojrzewających oraz płynnych produktów mleczarskich z wykorzystaniem szybkich, selektywnych testów dostępnych w systemie do analiz mikrobiologicznych Tempo (bioMerieux). Wykorzystano następujące testy: YM – drożdże i pleśnie, STA - liczba bakterii *Staphylococcus*, LAB - liczba bakterii mlekowych, EC - liczba *Escherichia coli*, CC - liczba bakterii z grupy coli, TC - liczba bakterii z grupy coli, EB - liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, TVC - ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych tlenowych. W tym elemencie pracy badawczej oceniano jakość mikrobiologiczną wybranych produktów mleczarskich, analizowano również możliwości zastosowania systemu TEMPO (bioMerieux) do sprawdzenia spełnienia kryteriów higieny i kryteriów bezpieczeństwa badanych produktów według Rozporządzenia WE 2073/2005. Jedną z metod, która skraca czas oczekiwania na wynik analizy, a przede wszystkim zmniejsza nakład materiałów i pracy, jest metoda oparta na zjawisku fluorescencji wykorzystywanym w urządzeniu TEMPO. Mechanizm odczytu polega na pomiarze sygnału fluorescencji w wyniku wzbudzenia światłem cząstek związku fluorescencyjnego uwolnionego na drodze reakcji przeprowadzonej przez mikroorganizmy znajdujące się w badanym produkcie. Istotną kwestią jest czas oczekiwania na wynik badań, szczególnie jeśli mamy do czynienia z produktami łatwo psującymi się.

Przedmiot badań stanowiły produkty mleczarskie zakupione w handlu detalicznym:

- sery dojrzewające: Gouda, Ementaler, Edam, Brie, Camembert,
- płynne produkty mleczarskie: mleko pasteryzowane, maślanka, kefir, jogurt pitny żurawinowy, jogurt naturalny.

W ramach doświadczenia przeprowadzono 3 powtórzenia analiz mikrobiologicznych (ocenie poddano produkty pochodzące z 3 różnych partii produkcyjnych). Na podstawie w/w rozporządzenia dla każdego produktu mleczarskiego zidentyfikowano mikroorganizmy w ramach kryteriów bezpieczeństwa i higieny. Analizy wykonane za pomocą urządzenia TEMPO wykazały, iż jakość mikrobiologiczna wybranych serów dojrzewających oraz płynnych produktów mleczarskich była zadowalająca. System TEMPO okazał się przydatnym narzędziem do określenia wskaźników stanowiących o czystości mikrobiologicznej badanych produktów (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IID: 23; pkt. IIIB: 17).

W zakresie badań przeanalizowano również możliwości wykorzystania dostępnych aplikacji prognozujących zachowanie drobnoustrojów w aspekcie zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności na przykładzie sera typu feta. Materiał porównawczy uzyskano z dwóch platform dostępnych online w internecie: Combase Predictor (CP) oraz WaMaPredictor (WMP). Porównano modele wzrostu pałeczek *Listeria monocytogenes* uzyskane z aplikacji WMP (wyniki pochodzą z badań prowadzonych na produktach spożywczych) oraz CP (wyniki pochodzą z badań na syntetycznych pożywkach). W aplikacji CP zdefiniowano wejściowe parametry fizykochemiczne sera feta: pH 4.5 oraz zawartość NaCl 5%. Dokonano oceny możliwości wykorzystania platform prognostycznych do oceny zagrożeń mikrobiologicznych. Po wprowadzeniu parametrów fizykochemicznych produktu uzyskano dane charakteryzujące dynamikę wzrostu mikroorganizmu: czas trwania lag fazy λ oraz specyficzne tempo wzrostu μ . Symulacje wzrostu pałeczek *L. monocytogenes*

przeprowadzono w temperaturze 6, 9 i 12°C. Matematyczną walidację prognoz przeprowadzono poprzez obliczenie współczynników A_f i B_f .

Uzyskane prognozy mogą być wykorzystane do wspierania funkcjonowania np. normy ISO 22000:2005 podczas spełnienia wymagań dotyczących planowania i realizacji wyrobów bezpiecznych (pkt. 7 normy). Narzędzia prognostyczne można wykorzystać zarówno w programach wstępnych - PRP (Prerequisite programmes) – pkt 7.2, (których celem jest m.in. wspieranie nadzoru nad poziomami zagrożenia bezpieczeństwa żywności), jak i w systemie HACCP (pkt. 7.4). Wszystkie zagrożenia powinny być identyfikowane w oparciu m.in. o doświadczenie pracowników, jak również informacje zewnętrzne. Stosowanie narzędzi mikrobiologii prognostycznej pozwala na prognozowanie wzrostu, przeżywalności i/lub inaktywacji drobnoustrojów podczas projektowania produktu oraz w gotowym wyrobie w trakcie całego okresu przydatności do spożycia (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IIA:3; pkt. IID:12,14,15,18,20; pkt. IIIB:11).

B) Systemy zarządzania bezpieczeństwem żywności

Moja działalność naukowo-badawcza związana była również z tematyką, którą inspirował mnie prof. dr hab. inż. Stefan Ziajka, a w którego zespole realizowałem badania związane z systemami zarządzania bezpieczeństwem żywności.

Wdrażanie systemów zapewniania jakości i bezpieczeństwa żywności wymaga monitorowania wielu parametrów produkcyjnych w celu zagwarantowania bezpieczeństwa wytwarzanego wyrobu. Celem tego etapu było przedstawienie możliwości praktycznego zastosowania metod statystycznych w systemie HACCP. Żaden proces produkcyjny nie zapewnia wykonania wszystkich elementów z pełną dokładnością, co jest powodem występowania zmienności, której przyczyny tkwią zarówno w procesie, jak i w otoczeniu. Metody statystycznego sterowania polegają na stałej obserwacji procesów i wychwytywaniu wszystkich nieprawidłowości w jego przebiegu. Istotą stosowania tych metod jest doprowadzenie do stanu ustabilizowania procesów technologicznych, a następnie osiągnięcie wymaganej zdolności. Przedmiotem badań były procesy wytwórcze wybranych produktów i spółdzielni mleczarskich o różnym poziomie rozwoju systemów zapewnienia jakości. Wyniki tego eksperymentu wykazały, że w przemyśle mleczarskim istnieje konieczność monitorowania wielu procesów. Podstawowym błędem popełnianym przy monitorowaniu parametrów procesów produkcyjnych jest to, że dane są wyłącznie zbierane i nie wykorzystywane w dalszych analizach i procesach decyzyjnych, nie dając rzetelnych informacji o stanie prowadzonego procesu. Dane należy poddać analizie statystycznej i na tej podstawie wnioskować o zmianach w procesie. Specyfika przemysłu spożywczego wymaga wdrożenia przede wszystkim obligatoryjnych systemów zapewnienia bezpieczeństwa żywności (GHP/GMP, HACCP)(Załącznik 4: Wykaz, pkt. IID: 1, 2 ; pkt. IIIQ:2.6, 2.9).

W ramach tego zagadnienia badawczego przeanalizowano: przesłanki wdrażania systemów zarządzania w zakładach mleczarskich, a także trudności i korzyści wynikających z wdrożonych systemów zarządzania oraz ocena popularności poszczególnych standardów.

Badanie przeprowadzono w 27 zakładach branży mleczarskiej. Narzędziem wykorzystanym w badaniu był kwestionariusz ankietowy, składający się z 13 pytań

dotyczących systemów zarządzania oraz 6 pytań metryczkowych. Badanie przeprowadzono w 2011 roku. Kwestionariusze ankietowe wysłano do 30 zakładów mleczarskich, które wcześniej wyraziły zgodę na ich wypełnienie. Badane zakłady mleczarskie zlokalizowane są w województwach: kujawsko – pomorskim (20%), mazowieckim (33%), podlaskim (20%) i warmińsko – mazurskim (27%). Dalszej analizie poddano 27 prawidłowo wypełnionych kwestionariuszy ankietowych. Wszystkie badane zakłady wdrożyły przynajmniej jeden system. Najczęściej wdrażane były GHP, GMP i HACCP, co wynikało z wymagań prawnych. Niestety uzyskane odpowiedzi wskazują na niepełne zrozumienie wymagań obligatoryjnych systemów, gdyż 85,2 % badanych zadeklarowało wdrożenie GHP, 92,6% respondentów GMP, a 88,9% systemu HACCP.

Zakłady mleczarskie ubiegają się najczęściej o certyfikaty systemów związanych z bezpieczeństwem żywności: HACCP (40,7%), ISO 22000 (22,2%) oraz systemu zarządzania jakością wg ISO 9001 (44,4%). Tylko 3 zakłady mleczarskie zdecydowały się na zmianę jednostki certyfikującej, ze względu na wysokie koszty certyfikacji, brak upoważnienia do certyfikacji niektórych systemów oraz brak rozpoznawalności międzynarodowej. Przedsiębiorstwa posiadające certyfikaty dbają o ich aktualność. Ponad połowa badanych zakładów (66%) zdecydowało się na integrację wdrożonych systemów zarządzania, z czego 44% zadeklarowało pełną integrację.

Głównymi przesłankami wdrażania systemów zarządzania przez badane zakłady były: wymogi stawiane przez sieci handlowe i klientów oraz poprawa wizerunku firmy. Ponad połowa ankietowanych zakładów mleczarskich wskazała koszty wdrożenia i przygotowanie dokumentacji jako największe trudności podczas wdrażania systemów zarządzania. Niewiele mniej respondentów (48,1%) uznało, że wdrażanie opracowanej dokumentacji systemowej i opór pracowników były ogromnymi barierami.

Do najczęściej wymienianych korzyści, wynikających z wdrożenia systemów zarządzania zaliczono uporządkowanie odpowiedzialności i uprawnień oraz wzrost świadomości pracowników. Za istotne zalety uznano też wdrożenie jasnych standardów pracy, poprawę wizerunku organizacji, usprawnienie obsługi klientów, poprawę konkurencyjności oraz zmniejszenie liczby niezgodności (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IID: 13).

C) Żywność funkcjonalna, wybrane aspekty

Kolejnym moim zainteresowaniem badawczym w zespole pod kierownictwem prof. dr hab. Stefana Ziajki były zagadnienia związane z żywnością funkcjonalną. Wzrost produkcji i konsumpcji mlecznych produktów funkcjonalnych wynika z postępu technicznego, wzrostu popytu na żywność minimalnie przetworzoną, wygodną i ekologiczną. Projektowanie mlecznych produktów funkcjonalnych ma na celu wzbogacenie istniejącej na rynku żywności o aspekty żywieniowe. W początkowym etapie tego zagadnienia badawczego zebrano informacje dotyczące składników mleka o wysokiej aktywności biologicznej, a także probiotyków i prebiotyków możliwych do wykorzystania w produkcji żywności funkcjonalnej, której spożywanie może ograniczyć występowanie najczęstszych schorzeń cywilizacyjnych XXI wieku (Załącznik 4: Wykaz, pkt. 2D: 6,9,16,19; pkt. IIK: 7). W aspekcie badań związanych z żywnością funkcjonalną przedstawiono możliwości produkcji deseru mlecznego o właściwościach funkcjonalnych. Opisano możliwości

technologiczne, wymagania prawne oraz szereg działań niezbędnych do zakwalifikowania produktu do grupy żywności funkcjonalnej. Przedstawiono informacje o stosowanych składnikach biologicznie aktywnych, ich mechanizmie działania oraz wpływie na organizm człowieka (mikroflora probiotyczna, substancje prebiotyczne, sterole i stanole roślinne, sprzężony dien kwasu linolowego, substancje fitochemiczne). Omówiono bioaktywne składniki mleka, oraz ich właściwości prozdrowotne. Następnie przeanalizowano i opisano możliwości i przeszkody związane z wprowadzeniem do deseru mlecznego składnika o właściwościach funkcjonalnych. Przeprowadzono i przedstawiono wyniki badania ankietowego mającego na celu poznanie opinii konsumentów na temat mlecznych produktów funkcjonalnych. Ankieta umożliwiła poznanie preferencji konsumentów odnośnie różnego rodzaju produktów funkcjonalnych oraz częstotliwości ich spożycia. Badania przeprowadzono na grupie młodych osób w wieku od 20 do 26 lat, a wyniki przedstawiają częstotliwość spożycia wśród nich żywności prozdrowotnej pochodzenia mleczarskiego. W rezultacie przeprowadzonego badania opisane zostały tendencje spożycia deserów mlecznych oraz opinie na temat deseru mlecznego o właściwościach funkcjonalnych. Większość ankietowanych spotkała się z pojęciem „żywność funkcjonalna” lub „żywność prozdrowotna”. Jest to najprawdopodobniej spowodowane coraz większym zainteresowaniem tego typu produktami wśród konsumentów. Znaczna część osób biorących udział w badaniu ankietowym spożywa desery mleczne okazjonalnie. Duża liczba (84,61%) badanej grupy byłaby zainteresowana produktem funkcjonalnym w postaci deseru mlecznego. Wprowadzenie na rynek tego typu produktu mogłoby wpłynąć na większe zainteresowanie deserami wśród konsumentów oraz spowodować wzrost ich spożycia. Zaprezentowano także możliwości wprowadzenia do deseru mlecznego takich składników jak inulina, białka serwatkowe, biologicznie aktywne peptydy, w tym peptydy o działaniu przeciwnadciśnieniowym, antymikrobiologicznym, przeciwutleniającym oraz kazeinofosfopeptydy. Przeanalizowane zostały czynniki technologiczne mogące być przeszkodą dla wprowadzenia deseru mlecznego zawierającego którykolwiek z tych składników. Wśród tych czynników znalazło się destrukcyjne działanie temperatury, pH oraz substancje utleniające. Zaproponowano rozwiązanie takich ograniczeń poprzez zastosowanie mikrokapsułkowania w odniesieniu do stosowanych dodatków funkcjonalnych (Załącznik 4: Wykaz, pkt. 2D: 11, pkt. IIIB: 5).

D) Technologia pozyskiwania nowych produktów mleczarskich na bazie produktów rozdziału membranowego mleka, ich charakterystyka i akceptowalność przez konsumenta

Kolejnym etapem moich badań jest działanie w zespole prof. dr hab. inż. Bogusława Staniewskiego i dr hab. inż. Justyny Żulewskiej gdzie tematyką badawczą, którą się zajmę jest kreowanie nowych produktów na bazie mleka i produktów rozdziału membranowego. Celem tego etapu pracy było określenie możliwości zastosowania koncentratu kazeiny micelarnej do produkcji mlecznych napojów niefermentowanych. Koncentrat kazeiny micelarnej (koncentrat MF) uzyskano w procesie mikrofiltracji (MF) mleka odtłuszczonego w systemie ciągłym. Do rozdziału zastosowano membranę ceramiczną o średnicy porów 0,1 μm . W trakcie procesu monitorowano skład fizykochemiczny retentatu i permeatu oraz

natężenie przepływu permeatu. Na bazie mleka odtłuszczonego oraz koncentratu MF wyprodukowano napoje mleczne o smaku truskawkowym i wiśniowym. Produkty zróżnicowano pod względem zawartości tłuszczu (0 i 2%) oraz białka (4,42% i 8,33%). Otrzymane napoje poddano konsumenckiej ocenie organoleptycznej z zastosowaniem 9-stopniowej skali hedonicznej. Ocenie poddano 4 wyróżniki sensoryczne: smak, zapach, barwę i konsystencję. Zastosowanie MF do frakcjonowania białek mleka stwarza możliwość uzyskania produktów o unikalnych właściwościach i szerokim spektrum zastosowań. Dotychczas, koncentrat kazeiny micelarnej był głównie wykorzystywany w produkcji serowarskiej, niemniej jednak produkcja napojów na bazie koncentratu, bogatych w białko i wapń, otwiera kierunki rozwoju nowych produktów. Warunkiem niezbędnym do zakończonego sukcesem rozwoju nowego wyrobu jest włączenie konsumenta w ten proces. Konsumencka ocena organoleptyczna umożliwia zaprojektowanie produktu o pożądanych przez konsumentów cechach. W wyniku przeprowadzonego rozdziału mleka za pomocą procesu MF wyprodukowano koncentrat białek o 4X współczynnika zagęszczenia. Zawartość kazeiny w retentacie po zakończonym procesie wynosiła 6,86%. Ocena organoleptyczna wykazała, że napoje z dodatkiem soku truskawkowego były bardziej atrakcyjne pod względem wszystkich ocenianych cech niż produkt z dodatkiem soku wiśniowego. Spośród wyprodukowanych napojów mlecznych najwyższe oceny uzyskały obydwa warianty smakowe (truskawka i wiśnia) o podwyższonej zawartości tłuszczu (2%) i zawartości białka na poziomie 8,33%. Najniższe oceny ankietowani przyznali natomiast próbkom napoju wiśniowego o zmniejszonej zawartości tłuszczu (0%) i zawartości białka 4,42%. W badaniach wykazano możliwość produkcji wyrobów o podwyższonej zawartości białka na bazie retentatu po procesie mikrofiltracji o korzystnych cechach sensorycznych. Produkcja wyrobów o zwiększonej zawartości białka wpływa na poprawę ich cech funkcjonalnych, zwiększenie wartości odżywczej oraz ogólnej atrakcyjności, a ponadto stanowi odpowiedź na rosnące zainteresowanie konsumentów tego typu produktami. Wzrasta świadomość konsumentów dotycząca odżywiania i coraz więcej osób racjonalnie wybiera produkty oraz komponuje dietę. Dużego znaczenia w tym aspekcie nabiera zapewnienie konsumentowi szerokiego asortymentu produktów o zróżnicowanych właściwościach i cechach, dzięki czemu konsument może dopasować produkty do swoich indywidualnych potrzeb i wymagań.

Ponadto, w trakcie realizacji są badania nad napojami z białkami micelnymi mleka, ale z udziałem bakterii fermentacji mlekowej (*Lactococcus lactis ssp. lactis* i *Lactococcus lactis ssp. cremoris*) (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IID: 21; pkt. IIK: 13; pkt. IIIB: 12,19,21,22,25,27; pkt. IIIQ: 2.7,2.10, 2.12).

Kolejnym rozdziałem badań, w których uczestniczyłem, a związanych z kreowaniem nowych produktów mleczarskich i ich modyfikacją było przeprowadzenie oceny jakości lodów wyprodukowanych na bazie mieszanek koncentratów białek serwatkowych i oleju roślinnego. Badano możliwości zastosowania koncentratów białek serwatkowych o różnej zawartości tłuszczu roślinnego jako bazy w produkcji mieszanek lodowych. Do przygotowania mieszanek lodowych zastosowano: cukier, bazę (preparaty białek serwatkowych o różnym dodatku tłuszczu roślinnego: 40 (A), 50 (B) i 55% (C)), proszek mleczny, stabilizator i aromat waniliowy. Dla uwodnionych mieszanek lodowych wyznaczano krzywe płynięcia i lepkość. Badano stopień napowietrzenia i teksturę otrzymanych lodów. Panel sensoryczny ocenił wyprodukowane lody pod kątem barwy,

tekstury, smaku i zapachu. Cechy organoleptyczne lodów z dodatkiem tłuszczu roślinnego porównano z tymi dla lodów śmietankowych. Mieszanki lodowe różniły się ($p < 0,05$) pod względem zawartości tłuszczu ($A = 3,52$, $B = 4,34\%$, $C = 4,76\%$) i białka ($A = 1,82\%$, $B = 1,58\%$, $C = 1,45\%$). Wszystkie mieszanki lodowe w postaci płynnej wykazywały właściwości lepkością płynów nie-Newtonowskich. Mieszanki o wyższej zawartości tłuszczu roślinnego łatwiej ulegały deformacji, niemniej jednak, nie stwierdzono różnic ($p > 0,05$) średniej wartości siły ścinania badanych mieszanek. Piana uzyskana z mieszanki C wykazywała najwyższą stabilność, i nie różniła się ($P > 0,05$) od mieszanki B. Stabilność pian dla mieszanki B nie różniła się ($P > 0,05$) od mieszanki A, ale stwierdzono różnice między stabilnością pian dla mieszanek A i C ($P < 0,05$). Stopień napowietrzenia malał wraz ze wzrastającą zawartością tłuszczu: 9,4, 5,5 i 3,3% odpowiednio dla mieszanek A, B i C. Im wyższa zawartość tłuszczu roślinnego tym lody wolniej ulegały topnieniu. Objętość lodów oznaczana metodą wyporu zależała od zawartości białka i tłuszczu. Najwyższą objętość odnotowano dla mieszanki A (95,33 ml) o najwyższej zawartości białka (1,82%). Nie stwierdzono różnic w sile nacisku, odzwierciedlającej twardość mieszanki, między badanymi próbkami. Lody otrzymane z badanych mieszanek zostały wyżej ocenione przez panel sensoryczny aniżeli lody śmietankowe. Nie stwierdzono różnic w ocenie smaku między badanymi mieszankami z dodatkiem tłuszczu roślinnego. Ogólna akceptowalność lodów wyprodukowanych z mieszanek A, B i C była wyższa aniżeli lodów wyprodukowanych na bazie śmietanki (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IIIB:7).

W 2012 roku decyzją Dyrektora Narodowego Centrum Nauki przyznano środki finansowe na realizację projektu *Właściwości reologiczno-sensoryczne serów o zmienionej proporcji α -kazeiny do β -kazeiny*. Jako główny wykonawca podczas realizacji projektu jestem odpowiedzialny za dużą część prac badawczych. Uczestniczę w wykonywaniu następujących zadań:

- 1) Określenie kluczowych parametrów rozdziału β -kazeiny z mleka odtłuszczonego przy zastosowaniu mikrofiltracji w temperaturach chłodniczych.
- 2) Ocena właściwości żelujących mleka o zmienionej proporcji α -kazeiny do β -kazeiny.
- 3) Zbadanie wpływu zmiany proporcji α -kazeiny: β -kazeiny na skład, wydajność i dojrzewanie serów typu holenderskiego.
 - 3.1. Mikrofiltracja mleka krowiego w skali ćwierć-technicznej w celu przygotowania mleka serowarskiego o różnej zawartości β -kazeiny.
 - 3.2. Produkcja trzech wariantów sera typu holenderskiego: (1) wyprodukowanych z mleka wzbogaconego w β -kazeinę, (2) o zmniejszonej zawartości β -kazeiny oraz (3) o normalnej zawartości poszczególnych frakcji białkowych (próba kontrolna).
 - 3.3. Ocena zmian proteolitycznych i teksturalnych w serach podczas dojrzewania, po 1, 30 i 60 dniach.

Realizacja badań w ramach tego projektu jest w końcowym, najważniejszym etapie. W chwili obecnej zrealizowano dwa zadania badawcze. W trakcie realizacji jest trzeci etap związany z produkcją serów o zmienionej proporcji α s-kazeiny: β -kazeiny. Uzyskane wyniki są opracowywane statystycznie i przygotowywane do publikacji. Wyniki badań zaprezentowano już na Szczycie Mleczarskim w Jokohamie w Japonii (2013 r.), podczas Cheese Symposium w Cork w Irlandii (2014 r.) oraz w trakcie International Conference on Predictive Modelling in Foods w Rio de Janeiro (Brazylia, 2015 r.) (Załącznik 4: Wykaz, pkt. IIIB:19,21,22,25).

VI. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWO-BADAWCZEGO

Mój dotychczasowy dorobek publikacyjny obejmuje:

- prace twórcze: **48** (w tym **8** opublikowano w czasopismach z IF);

Jedna praca została opublikowana w Journal of Dairy Science, który jest sklasyfikowany jako 2 na 51 czasopism w dziedzinie Agriculture, Dairy and Animal Science, przy czym na pierwszej pozycji jest Animal Genetics.

- komunikaty naukowe (postery i referaty): **41** (w tym 13 ogłoszonych osobiście);
- opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyzy: **6**;
- prace popularno-naukowe: **12**.

Wartość naukowa dorobku publikacyjnego do dnia 16. marca 2016 roku wynosi:

- punkty MNiSW: **422**;
- sumaryczny impact factor według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania: **6,231**;
- liczba cytowań według bazy Web of Science: **14** (bez autocytowań: 11);
- indeks Hirscha według bazy Web of Science: **3**;
- liczba cytowań według bazy Scopus: **24**.

Podczas pracy naukowej brałem udział w realizacji 6 grantów badawczych, w jednym, obecnie trwającym jestem głównym wykonawcą.

Za osiągnięcia w dziedzinie naukowej zostałem 4-krotnie nagrodzony przez Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Otrzymałem również wyróżnienie Rady Wydziału Nauki o Żywności UWM za pracę doktorską.

Ciągle doskonalenie kwalifikacji realizuję poprzez wyjazdy studyjne, szkolenia oraz warsztaty krajowe i zagraniczne. Podnoszenie poziomu wiedzy i rozwój w pracy naukowej dają podstawę do właściwego kształtowania warsztatu badawczego.

TABELARYCZNY WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

Kategoria	Liczba publikacji	IF ¹	Punkty MNiSW ²
Oryginalne prace twórcze przed uzyskaniem stopnia doktora			
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	2	0,259	30
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	5	-	53
Oryginalne prace twórcze po uzyskaniu stopnia doktora			
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	8	5,160	165
Publikacje w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	16	0,812	151
Publikacje w monografiach naukowych	5	-	23
Prace niepublikowane - sprawozdania, raporty, ekspertyzy	6	-	-
Prace popularno-naukowe	12	-	-
Referaty, komunikaty i doniesienia naukowe na konferencjach krajowych i międzynarodowych			
- przed uzyskaniem stopnia doktora	8	-	-
- po uzyskaniu stopnia doktora	33	-	-
Razem	95	6,231	422

¹ Impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania,

² Punkty MNiSW - Załącznik do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wzycznego z dnia 23 grudnia 2015 r.

