

INSTYTUT BIOTECHNOLOGII PRZEMYSŁU ROLNO-
SPOŻYWCZEGO im. prof. Wacława Dąbrowskiego

Załącznik nr 2:

**Autoreferat – opis dorobku i osiągnięć
naukowych**

dr inż. Barbara Sokołowska

Warszawa
2015-11-10

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	4
a) Tytuł osiągnięcia naukowego	4
b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	4
c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych	21
6. Tabelaryczne zestawienie dorobku naukowego	24

1. Imię i Nazwisko

Barbara Sokołowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej:

- 1979 - magister inżynier chemik o specjalności chemia i technologia spożywcza, Politechnika Łódzka, Wydział Chemii Spożywczej. Praca mgr pt.: Mutacja i selekcja szczepów *Aspergillus niger* o podwyższonej zdolności do biosyntezy kwasu cytrynowego, pod kierunkiem doc. dr hab. Anny Nowakowskiej.
- 2009 – doktor nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, specjalność mikrobiologia żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności. Praca dySSERTACYJNA pt.: Charakterystyka szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* izolowanych z różnych źródeł i regionów.
Promotor: prof. dr hab. Łucja Łaniewska-Trokenheim.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- od 2015 Instytut Wysokich Ciśnień Polskiej Akademii Nauk, Laboratorium Biomateriałów, Warszawa, Specjalista mikrobiolog.
- od 2009 Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego w Warszawie, Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych, Warszawa, Adiunkt.
- od 2007 Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego w Warszawie, Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych, Warszawa, Kierownik Pracowni Badania Jakości Mikrobiologicznej.
- 2003 - 2009 Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego w Warszawie, Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych, Warszawa, Asystent.
- 2000 - 2003 Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego w Warszawie, Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych, Warszawa, Mikrobiolog.
- 1996 - 2000 Centralny Ośrodek Badawczo Rozwojowy Przemysłu Gastronomicznego i Artykułów Spożywczych, Łódź, Asystent, Kierownik Pracowni Mikrobiologicznej.
- 1988 - 1993 Centrum Mikrobiologii i Wirusologii Polskiej Akademii Nauk, Łódź, Starszy asystent.
- 1979 - 1988 Politechnika Łódzka, Wydział Chemii Spożywczej, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Mikrobiolog.

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Moim osiągnięciem naukowym jest cykl siedmiu monotematycznych publikacji z lat 2012 - 2015 pod wspólnym tytułem:

Poprawa jakości mikrobiologicznej i zapewnienie bezpieczeństwa soków owocowych i warzywnych utrwalanych wysokim ciśnieniem hydrostatycznym.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Skąpska S., **Sokołowska B.**, Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A., 2012, Zastosowanie pasteryzacji wysokociśnieniowej do inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość., 3(82), 187-196. (IF₂₀₁₂ = 0,155, Lista A MNiSW 15 pkt, liczba cytowań = 0).
2. **Sokołowska B.**, Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A., Rzoska S.J., 2013, Factors influencing the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores exposed to high hydrostatic pressure in apple juice, High Pressure Res., 33(1), 73-82. (IF₂₀₁₃ = 0,901, Lista A MNiSW 25 pkt, liczba cytowań = 5).
3. **Sokołowska B.**, Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A., Rzoska S., 2012, The combined effect of high pressure and nisin or lysozyme on the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice, High Pressure Res., 32(1), 119-127. (IF₂₀₁₂ = 0,901, Lista A MNiSW 25 pkt, liczba cytowań = 8).
4. **Sokołowska B.**, Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Porębska I., Dekowska A., Rzoska J.S., 2015, Germination and inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores induced by moderate hydrostatic pressure, Pol. J. Microbiol., DOI: 10.5604/17331331.1170291 (IF_{5 lat} = 0,992, Lista A MNiSW 15 pkt, liczba cytowań = 0).
5. **Sokołowska B.**, Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Rutkowska M., Chotkiewicz M., Dekowska A., Rzoska S.J., 2013, The effect of high hydrostatic pressure on the survival of *Saccharomyces cerevisiae* in model suspensions and beetroot juice, High Pressure Res., 33(1), 165-171. (IF₂₀₁₃ = 0,901, Lista A MNiSW 25 pkt, liczba cytowań = 3).

6. **Sokołowska B.**, Skąpska S., Niezgoda J., Rutkowska M., Dekowska A., Rzoska S.J., 2014, Inactivation and sublethal injury of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure in model suspensions and beetroot juice, *High Pressure Res.*, 34(1), 147-155. (IF₂₀₁₄ = 0,926, Lista A MNiSW 25 pkt, liczba cytowań = 0).
7. **Sokołowska B.**, Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Rutkowska M., Dobros N., Rzoska J.S., 2014, The impact of high hydrostatic pressure (HHP) on native microflora and the colour of beetroot juice – a preliminary shelf-life study. In: *Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends*, Wageningen Academic Publisher. 380-384.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Utrwalanie żywności za pomocą wysokiego ciśnienia hydrostatycznego zostało zastosowane w skali przemysłowej po raz pierwszy w Japonii w roku 1990, do utrwalania dżemów, a następnie do utrwalania soków cytrusowych, dressingów i jogurtów. Od tego czasu nastąpił znaczny wzrost liczby przedsiębiorstw stosujących tę metodę na skalę przemysłową. Obecnie na świecie pracuje ponad 250 takich instalacji, a wartość rynku tych produktów oceniana jest na 7,34 mld USD, przy globalnej rocznej produkcji 500 mln kg [Tonello-Samson, 2014]. W Ameryce Północnej funkcjonuje 57% wszystkich linii produkcyjnych. W Europie zainstalowane jest aktualnie 26% światowej liczby urządzeń do ciśnieniowego utrwalania żywności, a liderem w tej dziedzinie jest Hiszpania, gdzie obecnie pracuje 15 instalacji przemysłowych.

Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego pozwala na eliminację mikroorganizmów z produktów spożywczych i przedłużenie ich trwałości z zachowaniem naturalnego smaku i zapachu oraz walerów odżywczych. Wysokie ciśnienie generalnie nie oddziałuje na składniki niskocząsteczkowe, takie jak witaminy, barwniki czy związki aromatyczne [Oey i in., 2008; Rastogi i in., 2007], jednak zastosowanie praktyczne powinno być potwierdzone indywidualnie dla każdego produktu [Barba i in., 2012]. Technologia ta szczególnie szerokie zastosowanie znalazła w utrwalaniu przetworów owocowych i warzywnych, takich jak soki i napoje oraz sosy, sałatki i dania warzywne. Do ich utrwalania służy 41% pracujących na świecie linii produkcyjnych. Kolejne grupy utrwalanych produktów stanowią mięso i jego przetwory (27% linii) oraz owoce morza i ryby (13 % linii produkcyjnych). W Polsce zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego do utrwalania żywności pozostaje nadal w sferze badań. Prace prowadzone są w kilku ośrodkach akademickich, posiadających odpowiednie wyposażenie, między innymi na Politechnice Gdańskiej, Uniwersytecie Warmińsko-

Mazurskim w Olsztynie oraz w Instytucie Wysokich Ciśnień PAN w Warszawie, współpracującym w tym zakresie od wielu lat ze Szkołą Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Państwowym Zakładem Higieny i Instytutem Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego. Ostatnio również na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie podjęto tego typu badania.

Celem naukowym prezentowanego przeze mnie cyklu publikacji jest ocena możliwości zastosowania wysokich ciśnień hydrostatycznych do eliminacji zarówno modelowych drobnoustrojów psujących, patogenów jak i naturalnej mikroflory soków, w aspekcie uzyskania bezpiecznych i trwałych produktów, z jednoczesną oceną niekorzystnych zjawisk stanowiących ograniczenia tej techniki.

Zanieczyszczenie soków przetrwalnikującymi bakteriami z rodzaju *Alicyclobacillus* spp. jest w ostatnich latach jednym z ważniejszych problemów w branży sokowniczej. Niekorzystne zmiany sensoryczne soków, nektarów i napojów, spowodowane wytwarzanymi przez niektóre gatunki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* metabolitami, nadającymi tym produktom zapach określany jako medyczny, dezynfekcyjny lub dymny, są przyczyną wycofywania z rynku gotowych produktów, a tym samym znacznych strat ekonomicznych [Cerny i in., 1984; Baumgart i in., 1997; Silva i in., 2000; Sokołowska, 2009; Sokołowska, 2014].

Polska jest znaczącym w Unii Europejskiej i w świecie producentem soków i nektarów owocowych, których roczna produkcja wynosi ponad 700 tys. ton. Przodujemy także w produkcji zagęszczonego soku jabłkowego, zajmując drugie miejsce na świecie (po Chinach), przy produkcji wynoszącej ok. 300 tys. ton rocznie [Nosecka, 2015].

Na podstawie wieloletnich badań, prowadzonych przez mnie w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, stwierdziłam powszechność występowania przetrwalników *Alicyclobacillus* spp. w polskich zagęszczonych sokach jabłkowych. Ponad 67% przebadanych próbek (n=1124 w latach 2002-2014) było zanieczyszczonych tymi bakteriami, a gatunek *Alicyclobacillus acidoterrestris*, odpowiedzialny za psucie soków, stanowił 30,4% wyizolowanych szczepów [dane niepublikowane]. Charakterystyka szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris*, izolowanych z próbek zagęszczonych soków jabłkowych, zagęszczonego soku pomarańczowego, zepsutego napoju pomarańczowego oraz emulsji do produkcji napojów, była przedmiotem mojej pracy dyplomowej na stopień doktora nauk rolniczych [Sokołowska, 2009].

Przetrwalniki tego gatunku wykazują wysoką ciepłooporność, zależną od szczepu, rodzaju soku, zawartości ekstraktu oraz pH. Przykładowe, cytowane w literaturze, wartości D_{95} (czas w minutach, niezbędny do dziesięciokrotnego zmniejszenia liczby żywych drobnoustrojów w temperaturze 95 °C) w sokach owocowych wynosiły od 1,85 min do 15,1 min [Splittstoesser

i in., 1994; Baumgart i in., 1997; Komitopolou i in., 1999; Sokołowska i in., 2008; Bevilacqua i in., 2011].

Wysoka ciepłooporność przetrwalników *A. acidoterrestris* oraz stwierdzone przypadki zepsucia handlowych pasteryzowanych soków, wskazują na nieskuteczność procesu pasteryzacji a tym samym na konieczność poszukiwania innych niż cieplne, metod ograniczenia wzrostu tych bakterii.

Zagadnieniu temu poświęcony był, realizowany w latach 2009 - 2011, projekt badawczy N N312 429337 „Zastosowanie pasteryzacji wysokociśnieniowej (HHP) do inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*”, którego byłam głównym wykonawcą.

Przed rozpoczęciem projektu w literaturze światowej dostępnych było zaledwie kilka publikacji dotyczących zastosowania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego do inaktywacji komórek wegetatywnych [Alpas i in., 2003] i przetrwalników *A. acidoterrestris* [Lee i in., 2002; Lee i in., 2006].

Wyniki uzyskane w tym projekcie przedstawiłam w trzech omówionych poniżej publikacjach. Pierwsza z cyklu to publikacja autorstwa: **Skąpska S., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A.: Zastosowanie pasteryzacji wysokociśnieniowej do inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2012, 3(82), 187-196. (IF₂₀₁₂ = 0,155, Lista A MNiSW 15 pkt)**. Wyniki te prezentowałam także na 22nd International ICFMH (The International Committee of Food Microbiology and Higiene of the International Union of Microbiological Societies) Symposium Food Micro w Kopenhadze w roku 2010 r. oraz na XL Sesji Naukowej KNoŻ PAN w Warszawie w 2011 r.

Celem pracy była ocena przydatności pasteryzacji wysokociśnieniowej do inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym (ekstrakt 11,2 °Bx, pH 3,4).

W pracy scharakteryzowano wpływ ciśnienia hydrostatycznego 300 i 500 MPa stosowanego w temperaturze 50 °C, na przeżywalność przetrwalników ośmiu szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym. Redukcja liczby przetrwalników po zastosowaniu ciśnienia 300 MPa przez 10 min wynosiła 1,27 - 3,46 log, w zależności od szczepu. Przedłużenie pasteryzacji do 30 min, zastosowane do dwóch najbardziej opornych szczepów, umożliwiło redukcję przetrwalników o 2,06 i 2,64 log. Podwyższenie stosowanego ciśnienia do 500 MPa nie spowodowało istotnego zwiększenia stopnia inaktywacji przetrwalników. Efektywniejsze okazało się zastosowanie ciśnieniowania pulsacyjnego. Stosowano sześć 5 minutowych cykli ciśnienia 100 MPa, 300 MPa i 500 MPa w temperaturze 50 °C. Największą redukcję liczby przetrwalników dwóch najbardziej opornych szczepów *A. acidoterrestris*, wynoszącą 2,40 i 3,11 log, uzyskano przy zastosowaniu ciśnienia 300 MPa. Ciśnieniowanie

pulsacyjne (100 MPa, 50 °C) połączone z godziną inkubacją w temperaturze 50 °C i kolejnym etapem ciśnieniowania w 500 MPa, spowodowało redukcję liczby przetrwalników o ponad 4 log.

W tych pierwszych doświadczeniach zaobserwowano interesujący fakt, a mianowicie, że większą redukcję liczby przetrwalników uzyskano stosując ciśnienie 300 MPa niż przy wyższym ciśnieniu 500 MPa. Na krzywych przeżywalności zaobserwowano niekorzystne zjawisko tzw. „ogonowania” czyli zmniejszania się stopnia inaktywacji przetrwalników w miarę wydłużania czasu stosowania ciśnienia. Pod względem aplikacyjnym efekty działania wysokiego ciśnienia, stosowanego zarówno w sposób ciągły jak i pulsacyjny, nie były zadawalające, zakładając, że skuteczny proces utrwalania wymaga inaktywacji mikroorganizmów co najmniej na poziomie 5 log [Vasavada, 2003].

Dalsze badania zmierzające do scharakteryzowania czynników wpływających na inaktywację przetrwalników *A. acidoterrestris* wysokim ciśnieniem hydrostatycznym prowadziłam stosując przetrwalniki wybranych dwóch najbardziej opornych szczepów (oznakowanych TO-117/02 i TO 29/4/02).

Wyniki tych badań przedstawiłam w publikacji: **Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A., Rzoska S.J.: Factors influencing the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores exposed to high hydrostatic pressure in apple juice, *High Pressure Res.*, 2013, 33(1), 73-82. (IF₂₀₁₃ = 0,901, Lista A MNiSW 25 pkt)**. Praca ta była także prezentowana przeze mnie na 50 European High Pressure Research Group Meeting w Salonikach w 2012 r. oraz na XXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Lublinie w 2012 r.

Celem pracy była ocena wybranych czynników wpływających na oporność przetrwalników *A. acidoterrestris* poddawanych działaniu ciśnienia hydrostatycznego i temperatury.

Rozpuszczalne składniki żywności takie jak cukry, białka i sole mineralne działają ochronnie na drobnoustroje i enzymy w produktach poddawanych procesom utrwalania, w tym wysokim ciśnieniem hydrostatycznym [Basak i in., 2002; Chauvin i in., 2006; Koseki i in., 2006; Lee i in., 2006]. W niniejszej pracy stwierdzono efekt ochronny składników zagęszczonego soku jabłkowego (ekstrakt 71,1 °Bx, pH 3,06) w stosunku do przetrwalników *A. acidoterrestris*. Po 45 min działania ciśnienia 200 MPa i temperatury 50 °C nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w liczebności przetrwalników. Czynnikiem działającym ochronnie są w tym przypadku prawdopodobnie cukry zawarte w zagęszczonym soku. W miarę obniżania zawartości ekstraktu w soku jabłkowym obserwowano zwiększenie stopnia inaktywacji, w zależności od szczepu, do 1,3 – 2,4 log w soku o ekstrakcie 35,7 °Bx, poprzez 2,6 - 3,3 log w soku o ekstrakcie 23,6 °Bx, aż do

redukcji wynoszącej 2,8 - 4,0 log w soku o zawartości ekstraktu 11,2 °Bx (minimalny ekstrakt handlowych soków odtworzonych z soku zagęszczonego) i pH 3,30.

Efektywność procesu inaktywacji przetrwalników okazała się zależna od zawartości ekstraktu w soku jabłkowym, stąd możliwości aplikacyjne procesu ciśnieniowania są ograniczone do soków o naturalnej zawartości ekstraktu.

Projektując procesy utrwalania soków lub innego rodzaju żywności, w której możliwy jest rozwój przetrwalników, należy mieć na uwadze różne czynniki warunkujące ich oporność. Jednym z takich czynników, oprócz temperatury i dostępności substancji odżywczych w trakcie powstawania przetrwalników, może być ich wiek. Jak dotąd, dostępna była tylko jedna publikacja świadcząca o zwiększeniu ciepłooporności przetrwalników *A. acidoterrestris* wraz z wiekiem [Vieira i in., 2002]. W przypadku jednego z badanych przez mnie szczepów (TO-117/02) oporność na działanie ciśnienia 200 MPa i temperatury 50 °C nie ulegała zmianie w okresie 23 miesięcy przechowywania przetrwalników. Natomiast dla przetrwalników drugiego szczepu (TO-29/4/02) nie uzyskano tak jednoznacznych wyników. Zaobserwowano niewielkie obniżenie oporności dla młodych 11 dniowych przetrwalników i niewielkie podwyższenie oporności dla przetrwalników przechowywanych przez 11 miesięcy.

Badania inaktywacji komórek wegetatywnych bakterii pod wpływem wysokich ciśnień hydrostatycznych wykazały istnienie zjawiska narastania oporności komórek przeżywających proces ciśnieniowania na działanie ciśnienia w kolejnych procesach oraz na działanie czynników takich jak ciepło, obecność kwasów czy nadtlenu wodoru w środowisku [Karatzas i Bennik, 2002; Hauben i in., 1997; Masschalack i in., 2000; Vanlint i in., 2012]. W niniejszej publikacji opisano takie zjawisko po raz pierwszy (według mojej wiedzy) w odniesieniu do przetrwalników. Wzrost oporności przetrwalników jednego z badanych szczepów *A. acidoterrestris* (TO-29/4/02) wyniósł aż 2,0 log w kolejnym – drugim procesie ciśnieniowania i 0,74 log w trzecim procesie. Drugi badany szczep (TO-117/02) wykazał nieco mniejszy wzrost oporności o 0,99 log w drugim procesie i 0,62 log w kolejnym. Uzyskane wyniki wskazują, że proces ciśnieniowania przy 200 MPa w temperaturze 50 °C może prowadzić do zwiększenia w populacji liczby przetrwalników o podwyższonej oporności na ciśnienie.

W celu inaktywacji przetrwalników za pomocą ciśnienia hydrostatycznego stosowane są dwa podejścia [Black i in., 2007; Matser i in., 2004]: zastosowanie wysokiego ciśnienia > 600 MPa i wysokiej temperatury >70 °C, co prowadzi do bezpośredniej inaktywacji lub zastosowanie łagodniejszych warunków, wywołujących kiełkowanie przetrwalników, które stają się bardziej wrażliwe na działanie innych czynników takich jak ciepło, konserwanty czy ponowne działanie ciśnienia (tzw. technologia płotków „*hurdle technology*”). Ten drugi sposób ma większe

możliwości aplikacyjne z uwagi na koszt linii produkcyjnej zwiększający się wraz ze wzrostem stosowanego ciśnienia.

Możliwość zastosowania technologii płotków, polegającej na połączenia działania ciśnienia hydrostatycznego, temperatury, nizyny lub lizozymu była przedmiotem badań, których wyniki przedstawiłam w publikacji: **Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A., Rzoska S.: The combined effect of high pressure and nisin or lysozyme on the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice, High Pressure Res., 2012, 32(1), 119-127. (IF₂₀₁₂ = 0,901, Lista A MNiSW 25 pkt)**. Praca ta była także prezentowana na 49th European High Pressure Research Group Meeting w Budapeszcie w 2011 r.

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania skojarzonego działania ciśnienia i umiarkowanej temperatury oraz nizyny lub lizozymu do inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym.

W pierwszej części pracy wykazano, że w ramach stosowania umiarkowanych ciśnień i podwyższonej temperatury, największą inaktywację osiągnięto stosując ciśnienie 200 MPa w temperaturze 50 °C. Redukcja wynosiła 2,8 log po 30 minutach działania ciśnienia na przetrwalniki jednego z najbardziej opornych szczepów z mojej kolekcji (*A. acidoterrestris* TO-29/4/02). Efekt ten uzyskano stosując zarówno ciśnienie w sposób ciągły jak i w sposób pulsacyjny (sześć 5 minutowych cykli), przy czym całkowita redukcja była istotnie większa przy pulsacyjnym sposobie działania ciśnienia i wynosiła 5 log. Według mojej wiedzy jest to pierwsza publikacja naukowa w której przedstawiono inaktywację przetrwalników *A. acidoterrestris* za pomocą ciśnienia pulsacyjnego.

Największą redukcję liczby przetrwalników *A. acidoterrestris*, wynoszącą 6,2 log, uzyskano po zastosowaniu czterech lub sześciu 5 minutowych cykli ciśnienia 200 MPa w temperaturze 50 °C, połączonego z godziną inkubacją w temperaturze 50 °C i kolejnym etapem ciśnieniowania w 500 MPa. Biorąc pod uwagę łagodne warunki prowadzenia procesu uzyskano bardzo dobry wynik, jednak ze względu na długi czas trwania procesu jego wartość aplikacyjna jest ograniczona.

We wcześniejszych swoich pracach wykazałam, że zarówno nizyna jak i lizozym wykazywały aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do przetrwalników i komórek wegetatywnych bakterii *A. acidoterrestris* [Sokołowska i in., 2012]. Znane i opisane jest również zjawisko obniżania ciepłoporności przetrwalników *A. acidoterrestris* [Komitopolou i in., 1999; Yamazaki i in., 2000] w obecności nizyny. W licznych publikacjach opisano zastosowanie nizyny i lizozymu jako czynników wspomagających inaktywację komórek wegetatywnych wielu

gatunków bakterii w procesach ciśnieniowania [Capelas i in., 2000; Gao i Ju, 2008; Masschalak i in., 2000; Qi i in., 2010; Yuste i in., 2000].

Dodatek nizyny do soku jabłkowego w stężeniu 250 IU/ml spowodował zwiększenie redukcji przetrwalników *A. acidoterrestris* TO-29/4/02 o 2 log. W efekcie uzyskano całkowitą redukcję przetrwalników (powyżej 6 log) po 45 min działania ciśnienia 200 MPa w temperaturze 50°C. Natomiast dodatek lizozymu w stężeniu 0,05 i 0,1 mg/ml nie przyniósł żadnych istotnych efektów. Niniejsza praca jest pierwszą przedstawiającą możliwości aplikacyjne nizyny w procesach ciśnieniowej inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris*.

W roku 2012 rozpoczęłam prace przy realizacji projektu „Badanie wpływu wysokich ciśnień hydrostatycznych oraz profilowanych silnych pól elektrycznych na własności mikrobiologiczne, biofizyczne i termodynamiczne modelowych bio-układów i żywności” (2011/01/B/NZ9/02537).

W ramach tego projektu badałam, między innymi, wpływ wysokich ciśnień na mikroflorę psującą soki (drożdże *Saccharomyces cerevisiae*), potencjalne patogeny (*Escherichia coli*, *Listeria innocua*) oraz kontynuowałam badania dotyczące kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris* pod wpływem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Wyniki tych ostatnich badań przedstawiłam w publikacji: **Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Porębska I., Dekowska A., Rzoska J.S.: Germination and inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores induced by moderate hydrostatic pressure, Pol. J. Microbiol., 2015, DOI: 10.5604/17331331.1170291 (IF_{5 lat} = 0,992, Lista A MNiSW 15 pkt).** Praca ta była także prezentowana przez mnie na 51 European High Pressure Research Group Meeting w Londynie w 2013 r.

Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych czynników na kiełkowanie i inaktywację przetrwalników *A. acidoterrestris* pod wpływem umiarkowanego ciśnienia hydrostatycznego.

Wyniki badań wskazują, że przetrwalniki *A. acidoterrestris* kiełkują pod wpływem umiarkowanego ciśnienia hydrostatycznego a czynniki takie jak ciśnienie, temperatura, czas, sposób aplikacji ciśnienia, rodzaj medium i jego pH oraz zawartość ekstraktu w soku jabłkowym wpływają na stopień ich kiełkowania i inaktywacji.

Badania dotyczące wpływu ciśnienia 100 – 500 MPa na kiełkowanie przetrwalników jednego z najbardziej opornych szczepów z mojej kolekcji (*A. acidoterrestris* TO-117/02) prowadzono przez 20 minut w temperaturze 50 °C, optymalnej dla ich wzrostu. Niskie pH, zarówno w buforze McIlvain (pH 4,0) jak i w soku jabłkowym (pH 3,4) stymulowało kiełkowanie przetrwalników. Najwyższy poziom kiełkowania uzyskano w buforze o pH 4,0 w przedziale ciśnień 200 - 300 MPa (3,75 - 3,74 log) i w soku jabłkowym po działaniu 200 MPa - 3,59 log.

Poziom inaktywacji przetrwalników w buforze pH 4,0 nie różnił się statystycznie w przedziale stosowanego ciśnienia 100 - 400 MPa i wynosił ok. 2 log. Podobnie w soku jabłkowym w przedziale ciśnień 100 - 300 MPa uzyskano inaktywację przetrwalników o 1,83 - 1,95 log. W zakresie zastosowanych ciśnień 100-400 MPa kiełkowanie przetrwalników na poziomie 2,69 – 2,95 log stwierdzono także w buforze o pH 7,0. Jednak w tych warunkach przetrwalniki nie ulegały inaktywacji większej niż 1 log.

Podwyższenie temperatury procesu do 70 °C silnie wpływało zarówno na stopień kiełkowania jak i inaktywacji przetrwalników. Osiągnięto kiełkowanie 5,84 log po 20 minutach ciśnieniowania w 200 MPa i 6,72 log po działaniu ciśnienia 500 MPa. Inaktywacja przetrwalników wynosiła 3,99 log w 200 MPa. Podwyższenie temperatury do 70 °C wpłynęło wyraźnie na efektywność działania ciśnienia 500 MPa i spowodowało łączną inaktywację na poziomie 6,13 log.

Generalnie, przy stosowaniu ciśnienia w sposób ciągły, kiełkowanie i inaktywacja przetrwalników zwiększała się wraz z wydłużeniem czasu stosowania ciśnienia i wraz z obniżaniem pH. Zastosowanie ciśnienia w sposób pulsacyjny spowodowało w roztworach buforowych nieco większe kiełkowanie i inaktywację przetrwalników szczepu TO-117/02 niż przy ciśnieniu stosowanym w sposób ciągły. Natomiast w soku jabłkowym wartości te były porównywalne. Należy jednak zaznaczyć, że w opisywanej wcześniej pracy [Sokołowska i in., 2012, pkt 4b), poz. 3] inaktywacja liczby przetrwalników innego szczepu *A. acidoterrestris* (TO-29/4/02) w soku jabłkowym była zdecydowanie wyższa po zastosowaniu ciśnienia pulsacyjnego niż po działaniu ciśnienia aplikowanego w sposób ciągły. Wyniki te wskazują na duże różnice pomiędzy przetrwalnikami różnych szczepów *A. acidoterrestris*.

W przedstawionej powyżej pracy [Sokołowska i in., 2013, pkt 4b), poz. 2] stwierdzono efekt ochronny zagęszczonego soku jabłkowego w stosunku do przetrwalników *A. acidoterrestris* poddawanych działaniu ciśnienia hydrostatycznego, co prowadziło do braku ich inaktywacji. Dodatkowo w niniejszej pracy stwierdzono, że w środowisku zagęszczonego soku jabłkowego (70 °Bx, $a_w = 0,93$) przetrwalniki nie kiełkują pod wpływem ciśnienia. W produktach o niskiej aktywności wody kiełkowanie może nie zachodzić właśnie z powodu braku niezbędnej do tego procesu wody.

Znajomość czynników wspomagających etap kiełkowania przetrwalników może być wykorzystana do zaprojektowania procesów ciśnieniowania zapewniających wyższy stopień ich inaktywacji. W ostatnich latach powstała nowa strategia inaktywacji przetrwalników polegająca na dwustopniowym prowadzeniu procesów - najpierw kiełkowanie a potem inaktywacja [Sarker i in., 2015]. Przetrwalniki tracą swoją oporność na czynniki fizyczne i chemiczne w czasie kiełkowania, przez co mogą być następnie inaktywowane w łagodniejszych warunkach. Wyniki

badania wskazują na możliwość zastosowania umiarkowanego ciśnienia hydrostatycznego do inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris*, co jest korzystne ze względu na zachowanie naturalnego smaku i zapachu oraz walorów odżywczych utrwalanych produktów.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są jednym z drobnoustrojów psujących soki wywołując spontaniczną fermentację zawartych w nich cukrów. Badania dotyczące możliwości ich inaktywacji za pomocą wysokiego ciśnienia hydrostatycznego stanowiły kolejny etap mojej pracy przedstawiony w publikacji: **Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Rutkowska M., Chotkiewicz M., Dekowska A., Rzoska S.J.: The effect of high hydrostatic pressure on the survival of *Saccharomyces cerevisiae* in model suspensions and beetroot juice, High Pressure Res., 2013, 33(1), 165-171. (IF₂₀₁₃ = 0,901, Lista A MNiSW 25 pkt).** Praca ta była także prezentowana przez mnie na 50 European High Pressure Research Group Meeting w Salonikach w 2012 r. oraz na XXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Lublinie w 2012 r.

Celem pracy była ocena przeżywalności komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* poddanych działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w zawiesinach modelowych i w soku z buraków ćwikłowych oraz sprawdzenie występowania komórek subletalnie uszkodzonych przy zastosowanych parametrach procesu.

Modelowe zawiesiny komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* NCFB 3191, o liczebności od 8 log jtk/ml do 5 log jtk/ml, zawieszono w buforze PBS o pH 7,2 poddano działaniu ciśnienia hydrostatycznego 300 MPa oraz temperatury 20 °C. Redukcja liczby komórek po 10 minutach działania ciśnienia wynosiła ok. 5 log, niezależnie od wyjściowego poziomu liczebności zawiesin. Przebieg krzywych przeżywalności wskazuje na zjawisko „ogonowania”; krzywe przybierają kształt wklęsły co świadczy o adaptacji komórek drożdży do czynnika stresowego, w tym wypadku ciśnienia. Do krzywych dopasowano modele liniowe i wykładnicze, przy czym współczynniki determinacji R^2 tych drugich były wyższe i wskazują na ich lepsze dopasowanie. Współczynniki determinacji zmniejszały się wraz ze wzrostem początkowej liczebności komórek w zawiesinach i wynosiły 0,99 i 0,98 odpowiednio dla zawiesin o liczebności 5,4 log jtk/ml i 6,3 log jtk/ml. Dla zawiesin o liczebności 7,4 log jtk/ml i 8,7 log jtk/ml współczynniki te wynosiły odpowiednio 0,90 i 0,89. Przyczyną gorszego dopasowania krzywych w zawiesinach o większej liczebności może być zlepianie komórek w czasie ciśnieniowania.

Redukcja liczby komórek *S. cerevisiae* zawieszonych w zakwaszonym soku z buraków ćwikłowych (ekstrakt 12,35 °Bx, pH 4,17) wynosiła 3,5 log po 10 min działania ciśnienia 300 MPa w 20 °C i była o 1,5 log niższa niż w przypadku zawieszenia komórek w buforze PBS. Stwierdzono więc, w tym przypadku, ochronne działanie środowiska soku na komórki drożdży.

Procesy utrwalania żywności, w tym zastosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych, mogą inaktywować komórki drobnoustrojów, powodować ich uszkodzenia subletalne lub pozostawiać je w stanie nienaruszonym. Uszkodzenia subletalne komórek mogą być odwracalne, szczególnie w środowisku zawierającym niezbędne składniki odżywcze. W ramach projektu wykonałam badania zmierzające do oceny występowania tego zjawiska w procesach utrwalania soków.

Do oznaczania komórek subletalnie uszkodzonych zastosowano metodę posiewu płytkowego z wykorzystaniem pożywki nieselektywnej (zapewniającej wzrost wszystkich komórek) i selektywnej (zapewniającej wzrost komórek nieuszkodzonych). Różnica pomiędzy liczebnością komórek uzyskaną na tych pożywkach odpowiada liczbie komórek uszkodzonych [Somolinos i in., 2008]. Przy zastosowanych parametrach procesu nie stwierdzono obecności subletalnie uszkodzonych komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* NCFB 3191, zarówno w buforze jak i w soku z buraków.

Z praktycznego punktu widzenia istotne jest, że drożdże *Saccharomyces cerevisiae* łatwo ulegają inaktywacji przy zastosowaniu umiarkowanego ciśnienia hydrostatycznego. Jednakże w trakcie projektowania procesu ciśnieniowania należy uwzględnić fakt występowania ochronnego działania soku z buraków na komórki drożdży *S. cerevisiae*.

Panujące aktualnie prozdrowotne trendy żywieniowe powodują zwiększenie zainteresowania żywnością bezpieczną, wysokiej jakości i jak najmniej przetworzoną. W przemyśle sokowniczym popularne stały się świeżo wyciskane, niepasteryzowane soki owocowe i warzywne. Ze względu na brak obróbki termicznej zachowują one świeży smak i zapach, mogą jednak stanowić źródło niepożądanego mikroflory.

Jak wynika z moich wcześniejszych badań [Sokołowska i in., 2011], obejmujących 9 rodzajów niepasteryzowanych, świeżo wyciskanych soków dostępnych na warszawskim rynku, największe zanieczyszczenie mikrobiologiczne występowało w sokach z warzyw korzeniowych. Dominujące grupy drobnoustrojów stanowiły w nich bakterie fermentacji mlekowej, drożdże i pleśnie, nie mniej jednak obecne były także drobnoustroje potencjalnie patogenne *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes*. Stąd zainteresowanie możliwościami inaktywacji tych patogenów za pomocą wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w celu uzyskania produktu bezpiecznego dla konsumenta, z zachowaniem naturalnego smaku i walorów odżywczych utrwalanych soków.

Uszkodzenia subletalne komórek, powstające w trakcie utrwalania, mogą być odwracalne co jest szczególnie niebezpieczne w przypadku patogenów w żywności bogatej w składniki odżywcze i o niskiej kwasowości. Uszkodzone subletalnie komórki mogą się zregenerować a następnie rozwijać w żywności w czasie jej przechowywania. W środowisku kwaśnym procesy

regeneracji mogą być zahamowane. W ramach projektu wykonałam badania zmierzające do oceny występowania tego zjawiska. Wyniki tych badań przedstawiłam w publikacji: **Sokołowska B., Skąpska S., Niezgoda J., Rutkowska M., Dekowska A., Rzoska S.J.: Inactivation and sublethal injury of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure in model suspensions and beetroot juice, High Pressure Res., 2014, 34(1), 147-155. (IF₂₀₁₄ = 0,926, Lista A MNiSW 25 pkt)**. Praca ta była także prezentowana przez mnie na 51 European High Pressure Research Group Meeting w Londynie w 2013 r.

Celem pracy była ocena przeżywalności szczepów *Escherichia coli* i *Listeria innocua* poddanych działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, w zawiesinach modelowych i w soku z buraków ćwikłowych, potwierdzenie występowania uszkodzeń subletalnych i określenie poziomu tego zjawiska w populacji przeżywającej procesy ciśnieniowania.

Szczep *L. innocua* zastosowano jako marker chorobotwórczej *Listeria monocytogenes* [Friedly i in., 2008; Kamat i Nair, 1996]. Modelowe zawiesiny komórek *E. coli* ATCC 7839 i *L. innocua* CIP 80.11T o liczebności od 7 log jtk/ml do 10 log jtk/ml zawieszono w buforze PBS o pH 7,2 poddano działaniu ciśnienia hydrostatycznego 400 MPa w temperaturze 20 °C. Redukcja liczby komórek *E. coli* po 10 min działania ciśnienia wynosiła ok. 3,4 - 4,1 log, w zależności od wyjściowego poziomu liczebności w zawiesinach. W tych samych warunkach redukcja liczby komórek *L. innocua* wynosiła 3,8 - 4,8 log, w zależności od ich liczebności w zawieszynie modelowej. Stopień inaktywacji obu szczepów zmniejszał się istotnie wraz ze wzrostem liczebności komórek w zawiesinach. Stąd zasada, że początkowa liczba drobnoustrojów w utrwalanym produkcie powinna być jak najniższa, pozostaje aktualna również w przypadku tej metody utrwalania.

W przebiegu krzywych przeżywalności szczepów *E. coli* i *L. innocua* zaobserwowano zjawisko „ogonowania”, świadczące o adaptacji komórek do stosowanego ciśnienia. Zjawisko to, niekorzystne dla skuteczności procesu utrwalania, jest obserwowane także w innych technikach i musi być uwzględniane przy projektowaniu parametrów procesów utrwalania.

Do opisu przebiegu krzywych zastosowano modele liniowe i wykładnicze. Podobnie jak w doświadczeniach z drożdżami *S. cerevisiae* lepsze dopasowanie uzyskano w przypadku funkcji wykładniczych. Współczynniki determinacji R^2 wynosiły od 0,889 do 0,958 dla *E. coli* i od 0,937 do 0,991 dla *L. innocua* i nie były zależne od liczebności komórek w zawiesinach.

Dla obu badanych szczepów nie stwierdzono ochronnego działania soku z buraków ćwikłowych (ekstrakt 12,34 °Bx, pH 4,18) na ciśnieniowane komórki. Inaktywacja w soku osiągała 6,2 log komórek *E. coli* po 10 min działania ciśnienia 400 MPa w porównaniu z 3,6 log w buforze PBS, przy tej samej wyjściowej liczebności komórek. W przypadku *L. innocua* efekt był jeszcze większy, już po 1 min działania ciśnienia 400 MPa szczep ulegał całkowitej

inaktywacji (ok. 7 log) w soku z buraków, podczas gdy w buforze inaktywacja wynosiła 4,8 log w tych samych warunkach procesu. Prawdopodobnie w tym przypadku większy wpływ na stopień inaktywacji miało niskie pH niż obecność składników o działaniu ochronnym.

Poziom uszkodzeń subletalnych określano jako różnicę liczebności populacji uzyskanych z posiewów na pożywkach niesektywnych i selektywnych. W przypadku *E. coli* stwierdzono uszkodzenia na poziomie 0,8 log po 1 min, 2,4 log po 5 min i 2,7 log po 10 min działania ciśnienia 400 MPa na zawiesinę komórek w buforze PBS (pH 7,2). W soku z buraków ćwikłowych uszkodzenia subletalne komórek *E. coli* następowały szybciej niż w buforze i wynosiły 2,9 log po 1 min działania ciśnienia 400 MPa. Po 5 minutach stanowiły 1,5 log i 0,8 log po 10 min ciśnieniowania. Uszkodzenia subletalne komórek *L. innocua* zawieszonych w buforze PBS wynosiły odpowiednio 1,2 log, 4,1 log i 2,2 log po 1, 5 i 10 min działania ciśnienia 400 MPa.

Podsumowując, stopień inaktywacji komórek *E. coli* i *L. innocua* poddanych działaniu ciśnienia hydrostatycznego był zależny od rodzaju medium i jego pH. Potwierdzono występowanie komórek uszkodzonych subletalnie w zależności od szczepu i medium. W celu zapewnienia bezpieczeństwa konsumentów wskazane jest stosowanie pożywek umożliwiających wzrost komórek subletalnie uszkodzonych.

Publikacja zamykająca cykl stanowiący osiągnięcie naukowe prezentuje doświadczenia zmierzające do inaktywacji naturalnej mikroflory i utrwalenia zakwaszonego soku z buraków ćwikłowych wysokim ciśnieniem hydrostatycznym i badania przechowalnicze utrwalonego produktu. Wyniki tej pracy prezentowałam na V International Conference on Environmental, Industrial and Applied BioMicroWorld 2013 w Madrycie i zostały one opublikowane w Proceeding Book. **Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Rutkowska M., Dobros N., Rzoska J.S., 2014, The impact of high hydrostatic pressure (HHP) on native microflora and the colour of beetroot juice – a preliminary shelf-life study. In: Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends, Wageningen Academic Publisher. 380-384.**

Celem pracy była ocena przydatności wysokiego ciśnienia hydrostatycznego do inaktywacji naturalnej mikroflory soku z buraków oraz jego wpływ na barwę soku bezpośrednio po procesie utrwalania jak i podczas przechowywania chłodniczego.

Wstępne badania [Sokołowska i in., 2011] wykazały, że liczba drobnoustrojów psujących w soku z buraków ćwikłowych wynosiła $2,1 \times 10^6$ – $2,4 \times 10^7$ jtk/ml, z czego większość stanowiły bakterie fermentacji mlekowej, drożdże i pleśnie. Scharakteryzowano wpływ ciśnienia 300 MPa i temperatury 20 °C na poszczególne grupy drobnoustrojów. Po 10 min działania

ciśnienia liczba drożdży zmniejszyła się o 4,2 log a liczba pleśni o 3,3 log. Bakterie fermentacji mlekowej okazały się najbardziej odporne na działanie ciśnienia – ich redukcja wynosiła 2,9 log. Ogólna liczba drobnoustrojów psujących ulegała zmniejszeniu o 4,1 log po 10 min działania ciśnienia.

Barwa soku z buraków jest wywołana obecnością barwników betalainowych. Czerwony barwnik betalainowy – betacyjanina odgrywa ważną rolę w zapobieganiu chorobom degeneracyjnym i nowotworowym [Kanner i in., 2001], a tradycyjne utrwalanie związane z obróbką termiczną prowadzi do znacznych strat barwników betalainowych w produktach z buraków ćwikłowych, pogarszając ich jakość organoleptyczną i zmniejszając właściwości prozdrowotne [Kidoń i Czapski 2007, Chandran i in., 2014].

Badania przechowalnicze przeprowadzono dla próbek soku z buraków poddanych działaniu ciśnienia 300, 400 i 500 MPa w temperaturze 20 °C przez 10 minut. Bezpośrednio po procesie ciśnieniowania liczba mikroorganizmów obniżyła się z 6,8 log jtk/ml do odpowiednio 3,0 log jtk/ml, 2,5 log jtk/ml i 1,3 log jtk/ml. W próbkach utrwalanych ciśnieniem 300 MPa liczba mikroorganizmów na poziomie 3 log jtk/ml utrzymywała się przez 6 dni przechowywania w lodówce a następnie wzrosła do powyżej 5 log jtk/ml. Próbkę soku utrwalonego ciśnieniem 400 MPa, wykazały przedłużenie trwałości do 10 dni w warunkach chłodniczych a następnie liczba mikroorganizmów wzrosła do 3,5 log jtk/ml. W soku utrwalanym ciśnieniem 500 MPa zmiany liczebności mikroflory psującej były nieistotne w trakcie 14 dniowego przechowywania w lodówce.

Zmiana barwy soku z buraków po działaniu ciśnienia 300 MPa była niezauważalna ($\Delta E < 0.5$) i słabo zauważalna w trakcie 14 dniowego przechowywania w lodówce ($\Delta E 0.5-1.5$). Po zastosowaniu ciśnienia 400 MPa zmiany barwy w całym okresie przechowywania były słabo zauważalne. Także po 3, 10 i 14 dniach przechowywania soku utrwalanego ciśnieniem 500 MPa zmiany barwy były słabo zauważalne. Jedynie po 6 dniach zaobserwowano zmianę barwy ΔE w wysokości 1,76, co kwalifikuje ją, w przyjętej [Barba i in., 2011] skali, jako zauważalną.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionych publikacji uważam:

1. Określenie czynników środowiskowych wpływających na efektywność kiełkowania i inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* pod wpływem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego.
2. Opracowanie warunków skutecznej inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym, za pomocą skojarzonego działania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i podwyższonej temperatury.

3. Wykazanie możliwości zastosowania nizyny jako substancji zwiększającej stopień inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* w procesach ciśnieniowania.
4. Wykazanie istnienia zjawiska narastania oporności przetrwalników *A. acidoterrestris*, przeżywających proces ciśnieniowania, na działanie ciśnienia w kolejnych procesach.
5. Opracowanie warunków inaktywacji wybranych patogenów i mikroflory psującej w soku z buraków ćwikłowych, za pomocą wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i uzyskanie produktu o trwałości mikrobiologicznej 10 dni w warunkach chłodniczych.
6. Potwierdzenie występowania uszkodzeń subletalnych komórek bakterii *E. coli* i *L. innocua*, w następstwie działania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego.

Uzyskane rezultaty mają duże znaczenie praktyczne dla zapewnienia bezpieczeństwa i odpowiedniej jakości mikrobiologicznej soków utrwalanych wysokim ciśnieniem hydrostatycznym.

Cytowana literatura:

- [1] Alpas H., Alma L., Bozoglu F.: Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juice by high hydrostatic pressure. *World J. Microbiol. Biotech.*, 2003, 19, 619-623.
- [2] Black E., Setlow P., Hocking A.D., Stewart C.M., Kelly A.L., Hoover D.G.: Response of spores to high – pressure processing. *Com. Rev. Food Sci. Food Safety*. 2007, 6, 103-119.
- [3] Barba F.J., Esteve M.J., Frigola A.: High Pressure Treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: a review. *Com. Rev. Food Sci. Food Safety*. 2012, 11, 307-322.
- [4] Barba F.J., Esteve M.J., Frigola A. Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Res. Int.* 2013;50:545-549.
- [5] Basak S., Ramaswamy H.S., Pulsed high pressure inactivation of pectin methyl esterase in single and concentrated orange juices. *Can. Biosyst. Engin.* 2001, 43, 3, 25–3.29.
- [6] Basak S., Ramaswamy H.S., Piette J.P.G., High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Inn. Food Sci. Emerg. Tech.*, 2002, 3, 223-231.
- [7] Baumgart J., Husemann M., Schmidt C.: *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Vorkommen, Bedeutung und Nachweis in Getränken und Getränkegrundstoffen. *Fluss. Obst*, 1997, 64, 178-180.
- [8] Bevilacqua A., Corbo M.R.: Characterization of a wild strain of *Alicyclobacillus acidoterrestris*: heat resistance and implications for tomato juice. *J. Food Sci.*, 2011, 76(2), M130-M136.
- [9] Capellas M., Mor-Mur M., Gervilla R., Yuste J., Guamis B.: Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiol.*, 2000, 17, 633-641.
- [10] Cerny G., Hennlich W., Poralla K.: Fruchtsaftverderb durch bacillen isolierung und charakterisierung des verderbserregers. *Z. Lebensmitt. Untersuch. Forsch.*, 1984, 179, 224-227.
- [11] Chauvin M.A., Chang S., Kang D.H., Swanson B.G.: Sucrose and ultra high pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Listeria innocua*. *J. Food Proc. Preserv.*, 2006, 30, 732-741.
- [12] Chandran J, Nisha P, Singal RS, Pandit AB. Degradation of colour in beetroot (*Beta vulgaris L.*): a kinetic study *J. Food Sci. Technol.*, 2014, 51(10), 2678-2684.
- [13] Friedly EC, Crandall PG, Ricke S, O'Bryan CA, Martin EM, Boyd LM.: Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. *J. Food Sci.*, 2008, 73(4), M174-M178.

- [14] Gao Y.L., Ju X.R.: Exploiting the combined effect of high pressure and moderate heat with nisin on inactivation of *Clostridium botulinum* spores. *J. Microbiol. Methods*, 2008, 72, 20-28.
- [15] Hauben K.J.A., Bartlett D.H., Soontjens C.C.F., Cornelis K., Wuytack E.Y., Michiels C.W.: *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(3), 945-50.
- [16] Kamat AS, Nair PM.: Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation *Listeria monocytogenes* by some meat processing treatments. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1996, 29, 714-720.
- [17] Kanner J, Harel S, Granit R. Betalains – A new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food. Chem.* 2001;49:5178–5185.
- [18] Kalchayanand N., Sikes A., Dunne C.P., Ray B.: Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol.*, 1998, 15, 207-214.
- [19] Karatzas K.A.G., Bennik M.H.J.: Characterization of *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 3183-3189.
- [20] Kidoń M, Czapski J.: Wpływ obróbki termicznej na zawartość barwników betalainowych i zdolność przeciwutleniającą buraka ćwikłowego. *Żywność. Nauka. Technol. Jakość*, 2007, 1(50), 124-131.
- [21] Komitopoulou E., Boziaris I.S., Davies E.A. Delves-Broughton J., Adams M. R.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1999, 34, 81-85.
- [22] Koseki S., Yamamoto K., pH and solute concentration media affect the outcome of high hydrostatic pressure treatment of *Listeria monocytogenes*. In. *J. Food Microbiol.*, 2006, 11, 175-179.
- [23] Lee S.Y., Chung H.J., Kang D.H., Combined treatment of high pressure and heat on killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate. *J. Food Protect.*, 2006, 69(5), 1056-1060.
- [24] Lee S.Y., Dougherty R.H., Kang D.H.: Inhibitory effect of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 4158-4161.
- [25] Masschalack B., Garcia-Graells C., Van Haver E., Michiels C.: Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. *Inn. Food Sci. Emer. Tech.*, 2000, 1, 39-47.
- [26] Matser A.M., Krebbers B., van den Berg R.W., Bartels P.V.: Advantages of high pressure sterilization on quality of food products. *Trends Food Sci. Tech.*, 2004, 15, 79-85.
- [27] Nosecka B.: Rynek zagęszczonego soku jabłkowego. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2015, 4, 2-4.
- [28] Oey I., Lille M., Van Loey A., Hendrickx M.: Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2008, 19, 320–328.
- [29] Qi W.M., Qian P., Yu J.Y., Zhang X.J., Lu R.R.: Combine effect of high hydrostatic pressure and nisin on loss of viability, membrane damage and release of intracellular contents of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Int. J. Food Engin.*, 6 (2010), doi: 10.2202/1556-3758.1873.
- [30] Reineke K., Doehner I., Schlumbach K., Baier D., Mathys A., Knorr D.: The different pathways of spore germination and inactivation in dependence of pressure and temperature. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, 2012, 13, 31–41.
- [31] Rastogi N.K., Raghavarao S.M.S., Balasubramaniam V.M., Niranjan K., Knorr D.: Opportunities and challenges in high pressure processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2007, 47, 69–112.
- [32] Sarker M.R., Akhtar S., Torres A., Paredes-Sabja D.: High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores. *Critical Reviews in Microbiology*, 2015, 41(1), 18-26.
- [33] Silva F.V.M., Gibbs P., Silva C.L.M.: Establishing a new pasteurization criterion based on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores for shelf-stable high – acidic fruit products. *Fruit Process.*, 2000, 10 (4), 138-141.
- [34] Somolinos M, García D, Pagán R, Mackey B.: Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 7570–7575.

- [35] Sokołowska B.: *Alicyclobacillus* – termofilne kwasolubne bakterie przetrwalnikujące – charakterystyka i występowanie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2014, 4(95), 5-17.
- [36] Sokołowska B.: Charakterystyka szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* izolowanych z różnych źródeł i regionów. Praca dyplomowa na stopień doktora nauk rolniczych. 2009, Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie. Wydział Nauki o Żywności.
- [37] Sokołowska B., Chotkiewicz M., Niezgoda J., Dekowska A.: Ocena zanieczyszczenia mikrobiologicznego świeżych, niepasteryzowanych, wyciskanych soków owocowych i warzywnych dostępnych w handlu. *Zeszyty Probl. Post. Nauk Roln.*, 2011, 569, 219-228.
- [38] Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M.: Ciepłooporność przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2008, 12, 22-27.
- [39] Sokołowska B., Niezgoda J., Chotkiewicz M.: Wpływ nizyny i lizozymu na wzrost szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* oraz możliwość zastosowania tych związków jako biokonserwantów w soku jabłkowym, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2012, 4(83), 44-54.
- [40] Splittstoesser D.F., Churey J.J., Lee C.Y.: Growth characteristic of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *J. Food Protect.*, 1994, 57 (12), 1080-1083.
- [41] Tonello-Samson C.: Industrial application of high pressure processing in food industry. 8th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology. 2014, Nantes (Francja), 48.
- [42] Vanlint D., Rutten N., Michiels C.W., Aertsen A.: Emergence and Stability of High-Pressure Resistance in Different Food-Borne Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78(9): 3234–3241.
- [43] Vasavada P.C.: Alternative Processing Technologies for the Control of Spoilage Bacteria in Fruit Juices and Beverages. W: Beverage quality and Safety. Foster T., Vasavada P.C., (red.). CRC PRESS, Institute of Food Technologists, Boca Raton, London, New York, Washington D. C., 73-93.
- [44] Vieira M.C., Teixeira A.A., Silva F.M., Gaspar N., Silva C.L.M.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. *Int. J. Food. Microbiol.*, 2002, 77, 71-81.
- [45] Yamazaki K., Murakami M., Kawai Y., Inoue N., Matsuda T.: Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiol.*, 2000, 17, 315-320.
- [46] Yuste J., Mor-Mur M., Guamis B., Pla R.: Combination of high pressure with nisin or lysozyme to further process mechanically recovered poultry meat. *High Pressure Research*, 2000, 19, 85-90.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:

Mój dotychczasowy dorobek naukowy dotyczy głównie następujących zagadnień badawczych:

1. Charakterystyka kwasolubnych przetrwalnikujących termofilnych bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*, ich rola w psuciu soków owocowych oraz metody ograniczenia ich wzrostu.
2. Jakość mikrobiologiczna soków owocowych i warzywnych oraz niekonwencjonalne metody ich utrwalania.
3. Wpływ wysokich ciśnień hydrostatycznych na wybrane mikroorganizmy.
4. Zapewnienie jakości wyników badań mikrobiologicznych.
5. Ocena przydatności aparatów i systemów stosowanych w badaniach jakości mikrobiologicznej.

Charakterystyka kwasolubnych przetrwalnikujących termofilnych bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*, ich rola w psuciu soków owocowych oraz metody ograniczenia ich wzrostu.

Prace badawcze, w tym wykonywane na potrzeby zakładów przetwórstwa owocowego, dotyczące izolacji, identyfikacji i charakterystyki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* realizowane są w Pracowni Badania Jakości Mikrobiologicznej, której jestem kierownikiem od roku 2002. Nasza placówka jest przodującą i jedną z nielicznych w Polsce zajmujących się tą tematyką. Posiadamy wdrożony i certyfikowany system zarządzania zgodny z normą PN-ISO/IEC 17025:2005 +A1:2007. Pod moim kierownictwem zrealizowano trzy projekty naukowo-badawcze (w ramach dotacji na działalność statutową Instytutu): „Występowanie i metody oznaczania wybranych drobnoustrojów ciepłopornych stanowiących zagrożenie dla jakości soków owocowych”, „Charakterystyka szczepów *Alicyclobacillus* izolowanych z soków owocowych i warzywnych” i „Zastosowanie naturalnych czynników przeciwdrobnoustrojowych do ograniczenia wzrostu szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris*”. Ponadto byłam współautorem trzech projektów: „Wykrywanie lotnych produktów zepsucia soków owocowych powodowanych przez *Alicyclobacillus acidoterrestris*”, „Zastosowanie metod biologii molekularnej do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów szkodliwych w przetwórstwie owoców i warzyw” oraz „Badanie dynamiki kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem wybranych czynników aktywujących” (wykaz II E, poz.: 2, 4, 8, 9, 10, 12). Wyniki badań zostały przedstawione w mojej pracy dyplomowej na stopień doktora, w 14 publikacjach w czasopiśmie naukowych (wykaz II A, poz.: 1, 4, 5, wykaz II D, poz.: 4, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 29), w 12 komunikatach i 17 posterach prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych (wykaz III B, poz.: 1, 6, 7, 13, 15, 20, 23, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 52, 58, 59, 61) oraz w 5 referatach wygłoszonych przez mnie na

konferencjach i seminariach głównie dla pracowników przemysłu sokowniczego i napojowego (wykaz III I, poz.: 6, 8, 14, 20, 34).

Celem naukowym zrealizowanych prac była: charakterystyka wybranych szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* wyizolowanych z polskich surowców, ocena wpływu czynników środowiskowych na ich kiełkowanie, wzrost i wytwarzanie metabolitów obniżających jakość soków a także popularyzacja tej wiedzy wśród polskich producentów soków.

Jakość mikrobiologiczna soków owocowych i warzywnych oraz niekonwencjonalne metody ich utrwalania.

Charakterystyka mikroflory świeżo wyciskanych niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych dostępnych w handlu była przedmiotem prowadzonego w latach 2011-2012, pod moim kierownictwem, projektu badawczego (wykaz II E, poz.: 7) Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji (wykaz II D, poz.: 12), w postaci komunikatu (wykaz III B, poz. 31) i posteru na konferencjach krajowych (wykaz III B, poz.: 38) oraz w referacie wygłoszonym przez mnie na seminarium dla pracowników przemysłu sokowniczego i napojowego (wykaz III I, poz.: 12).

Możliwości zastosowania nowoczesnych, alternatywnych do termicznych, technik utrwalania soków są przedmiotem moich zainteresowań naukowych od kilku lat. Jestem współautorem projektów badawczych dotyczących zastosowania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, ditlenku węgla pod wysokim ciśnieniem lub w stanie nadkrytycznym oraz pulsujących pól elektrycznych (PEF) do inaktywacji drobnoustrojów w sokach (wykaz II E, poz.: 1, 3). Efektem prowadzonych prac, oprócz opracowanej dokumentacji, były 4 publikacje (wykaz II D, poz.: 2, 3, 6, 10) oraz 5 komunikatów i 12 posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych (wykaz III B, poz.: 2, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 27, 29, 33).

Wpływ wysokich ciśnień hydrostatycznych na wybrane mikroorganizmy.

W trakcie realizacji projektu 2011/01/B/NZ9/02537 prowadzono także prace nie związane bezpośrednio z sokami owocowymi i warzywnymi. Podjęto próbę utrwalania za pomocą ciśnienia hydrostatycznego, mleka kobycego gromadzonego przez banki mleka na potrzeby noworodków i niemowląt. Badano także własności dielektryczne komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* poddanych działaniu ciśnienia hydrostatycznego. W wyniku tych prac powstały dwie publikacje (wykaz II A, poz.: 2 i 3) i 1 poster prezentowany na konferencji zagranicznej (wykaz III B, poz.: 11).

Zapewnienie jakości wyników badań mikrobiologicznych.

W zakresie moich zainteresowań zawodowych znajduje się również tematyka związana z zapewnieniem jakości badań wykonywanych w laboratoriach mikrobiologicznych badających żywność. Jako pracownik akredytowanego laboratorium oraz auditor techniczny Polskiego Centrum Akredytacji (od roku 2001) opublikowałam 7 artykułów (wykaz II D, poz.: 23, 25, 26, 27, 30, 31, 32) oraz wygłosiłam 16 referatów na konferencjach/seminariach głównie dla pracowników akredytowanych laboratoriów, w tym inspekcji sanitarnej i weterynaryjnej (wykaz III I, poz.: 1, 5, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 19, 21, 24, 28, 29, 31, 32, 33). Jestem także autorem dwóch monografii dotyczących w/w zagadnień (wykaz II D, poz.: 21, 24).

Celem publikacji było przedstawienie zasad walidacji metod mikrobiologicznych badania żywności oraz metod kontroli jakości badań, w tym także kontroli pożywek stosowanych w tych badaniach.

Ocena przydatności aparatów i systemów stosowanych w badaniach jakości mikrobiologicznej.

W latach 2005 -2014 w kierowanej przeze mnie Pracowni poddano ocenie przydatności trzy aparaty/systemy: zautomatyzowany analizator mikrobiologiczny BacT/ALERT® 3D (bioMerieux), Tempo (firmy bioMerieux) oraz EZ-Fluo firmy Merck-Millipore. W efekcie tych działań powstało 6 artykułów (wykaz II D, poz.: 1, 5, 19, 22 i wykaz III I, poz.: 15, 27). Oraz 4 referaty wygłoszone przez mnie na seminariach dla pracowników przemysłu sokowniczego i napojowego (wykaz III I, poz. 4, 9, 22, 26).

Celem naukowym zrealizowanych badań było niezależne i wiarygodne przedstawienie możliwości analitycznych ocenianych aparatów/systemów tak aby wyniki były przydatne dla przyszłych użytkowników.

6. Tabelaryczne zestawienie punktacji dorobku naukowego

	Przed uzyskaniem stopnia doktora			Po uzyskaniu stopnia doktora				Łączna punktacja
	Liczba	IF*	Punkty MNiSW*	Liczba	IF*	Punkty MNiSW*	Cytowania	
Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	-	-	-	11	8,69	240	16	240
Publikacje naukowe w czasopismach nie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	17	-	34	17	-	44	-	78
Monografie	2	-	-	-	-	-	-	-
Dokumentacja prac badawczych	6	-	-	8	-	-	-	-
Komunikaty na międzynarodowych konferencjach naukowych	2	-	-	4	-	-	-	-
Postery na międzynarodowych konferencjach naukowych	3	-	-	19	-	-	-	-
Komunikaty na krajowych konferencjach naukowych	5	-	-	13	-	-	-	-
Postery na krajowych konferencjach naukowych	16	-	-	7	-	-	-	-
Referaty na konferencjach i szkoleniach dla przemysłu sokowniczego i akredytowanych laboratoriów	12	-	-	19	-	-	-	-
Łączna punktacja	-	-	34	-	-	284	-	318

*zgodnie z rokiem publikacji

Biologowanie