

---

# AUTOREFERAT

---

---

**DR INŻ. MARTA HANNA MIKŠ (MIKŠ-KRAJNIK)**

**KATEDRA MIKROBIOLOGII PRZEMYSŁOWEJ I ŻYWNOŚCI**

**WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI**

**UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE**

**10-719 OLSZTYN, PLAC CIESZYŃSKI 1**

E-mail: [marta.miks@uwm.edu.pl](mailto:marta.miks@uwm.edu.pl)

---

**OLSZTYN 2017**

---

**SPIS TREŚCI**

<b>I. DANE OSOBOWE.....</b>	<b>3</b>
<b>II. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE.....</b>	<b>3</b>
<b>III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....</b>	<b>4</b>
<b>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.): .....</b>	<b>5</b>
A) TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO .....	5
B) PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO .....	5
C) OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.	8
Wprowadzenie .....	8
Cel i zakres badań .....	11
Wyniki i wnioski.....	13
Podsumowanie .....	19
Literatura.....	21
<b>V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH.....</b>	<b>23</b>
A) Molekularne metody detekcji mikroorganizmów .....	23
B) Fermentacja i organiczne związki lotne.....	25
C) Utrwalanie produktów spożywczych.....	26
D) Inżynieria żywności .....	27
<b>VI. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWO-BADAWCZEGO .....</b>	<b>28</b>
TABELARYCZNY WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO .....	29

**MARTA HANNA MIKŠ (uprzednio MIKŠ-KRAJNIK)****I. DANE OSOBOWE**

Adres służbowy i korespondencyjny (Dania): Kogle Allé 4, 2970 Hørsholm

Adres zameldowania (Polska): ul. Prosta 7/9 m 7, 10-028 Olsztyn

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

Kom: +45 5037 2222 (Dania)

Kom: +48 507 705 703 (Polska)

E-mail: [marta.miks@uwm.edu.pl](mailto:marta.miks@uwm.edu.pl)

Data i miejsce urodzenia: 28.04.1980, Lidzbark Warmiński, Polska

- LinkedIn: [www.linkedin.com/in/marta-mikš](http://www.linkedin.com/in/marta-mikš)
- ResearchGate: [https://www.researchgate.net/profile/Marta\\_Miks](https://www.researchgate.net/profile/Marta_Miks)
- Google Scholar: <http://scholar.google.pl/citations?user=9ijV5ygAAAAJ&hl=pl>

**II. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE**

2004

**Magister inżynier**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności

Technologia żywności i żywienie człowieka, Specjalizacja: Biotechnologia żywności

Praca dyplomowa na temat: *Opracowanie dostępnej on-line bioinformatycznej bazy danych dotyczącej enzymów lipolitycznych*

Promotor: dr hab. inż. Marek Adamczak, prof. UWM

2005

**Magister inżynier**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności

Towaroznawstwo, Specjalizacja: Organizacja krajowego i międzynarodowego obrotu towarów

Praca dyplomowa na temat: *Żywność funkcjonalna – badanie warunków biokonwersji kwasu rycynowego do sprzężonego kwasu linolowego przez wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej.*

Promotor: dr inż. Zbigniew Borejszo

2011

**Doktor nauk rolniczych**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauki o Żywności

Technologia żywności i żywienie człowieka, Specjalizacja: Biotechnologia żywności

Tytuł rozprawy: *Studia nad fizjologią i metabolizmem bakterii mlekowych i propionowych w mleku oraz w modelowych etapach produkcji sera dojrzewającego typu szwajcarsko-holenderskiego*

Promotor: Prof. dr hab. inż. Andrzej Babuchowski

**III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH****Asystent stażysta***01.10.2004 - 30.06.2005*

Katedra Biotechnologii Żywności

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

**Doktorant***01.10.2005 - 30.09.2010*

Dzienne studia doktoranckie, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności

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

**Asystent***01.12.2008 - 01.11.2011*

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności

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

**Adiunkt***01.11.2011 - dotychczas*, w tym:*01.02.2013 - 01.03.2014* – płatny urlop naukowy*01.03.2014 - dotychczas* – bezpłatny urlop naukowy

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności

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

**Koordynator i wykładowca***01.06.2011 - 31.12.2012*

Pre-medical Biology Courses (MCAT) for International Students w ramach International Gateway to Science and Medicine Program, Polska

English Perfect &amp; Wydział Nauk Medycznych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

**Naukowiec wizytujący***04.02.2013 - 06.08.2015*

Food Science and Technology (FST) Programme

c/o Department of Chemistry, National University of Singapore, Singapur

**Menadżer/Kierownik badań naukowych***15.08.2015 – 31.07.2017*

Yeast and Fermentation Department

Carlsberg Research Laboratory, Carlsberg Group, Kopenhaga, Dania

**Menadżer/Kierownik ds. regulacyjnych i badań naukowych***01.08.2017 - dotychczas*

Regulatory Department, Glycom A/S, Kogle Allé 4, Hørsholm, Dania

#### 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

Osiągnięciem będącym podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego stanowi spójny tematycznie cykl pięciu publikacji, pod wspólnym tytułem:

*‘Chemiczne i mikrobiologiczne wskaźniki trwałości przechowalniczej i bezpieczeństwa artykułów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego’*, opisujący:

- opracowanie i optymalizacje metody chromatograficznej do oceny stanu zepsucia produktów nieprzetworzonych w czasie na przykładzie piersi z kurczaka (*publikacja 1*),
- ocenę stanu zepsucia nieprzetworzonej żywności pochodzenia zwierzęcego metodami mikrobiologicznymi, chemicznymi i sensorycznymi na przykładzie surowego łososia norweskiego oraz piersi z kurczaka (*publikacje 2-3*),
- zastosowanie wybranych technik konserwacji żywności do przedłużenia jej trwałości mikrobiologicznej (*publikacje 4-5*).

Wszystkie prace zostały zrealizowane podczas stażu naukowego w Food Science and Technology (FST) Programme, c/o Department of Chemistry, National University of Singapore (NUS) w Singapurze (który zajmuje 12 pozycje w Światowym Rankingu Uniwersytetów). Staż odbyłam w zespole doktora Hyun-Gyun Yuk’a, renomowanego specjalisty w zakresie bezpieczeństwa żywności.

##### B) PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

1. **Mikš-Krajnik M.**, Yoon Y.J., Yuk H.G. 2015. Detection of volatile organic compounds as markers of chicken breast spoilage using HS-SPME-GC/MS-FASST. *Food Science and Biotechnology* 24(1): 361-372.

**IF<sup>1</sup> = 0.695; MNiSW<sup>2</sup> = 20; Liczba cytowań<sup>3</sup> = 5**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji badań i doświadczeń w celu opracowania nowej metody chromatograficznej do analizy związków lotnych, doborze metody analitycznej, optymalizacji, weryfikacji i walidacji nowej metody, analizie statystycznej (PCA, Principal Component Analysis), interpretacji wyników oraz napisaniu publikacji. Mój udział procentowy wynosi 90%.*

2. **Mikš-Krajnik M.**, Yoon Y.J., Ukuku D.O., Yuk H.G. 2016. Volatile chemical spoilage indexes of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored under aerobic condition in relation to microbiological and sensory shelf lives. *Food Microbiology* 53: 182-191.

**IF<sup>1</sup> = 3.682; MNiSW<sup>2</sup> = 40; Liczba cytowań<sup>3</sup> = 7**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji badań i doświadczeń, wykonaniu analiz mikrobiologicznych, chromatograficznych oraz sensorycznych (w tym wyznaczenie lub predykcja mikrobiologicznej, chemicznej i sensorycznej daty przydatności do spożycia), a także analiz statystycznych (PLS, Partial least square regression, CA, cluster analysis), modelowaniu matematycznym krzywych wzrostu mikroorganizmów, interpretacji wyników oraz napisaniu publikacji. Mój udział procentowy wynosi 85%.*

3. **Mikš-Krajnik M., Yoon Y.J., Ukuku D.O., Yuk H.G.** 2016. Identification and quantification of volatile biomarkers associated with growth of microorganisms in aerobically spoiled chicken meat. *Journal of Food Science* 81(8): M2006-M2014.

**IF<sup>1</sup> = 1.649; MNiSW<sup>2</sup> = 30; Liczba cytowań<sup>3</sup> = 0**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji badań i doświadczeń, wykonaniu analiz mikrobiologicznych, chromatograficznych oraz sensorycznych (w tym wyznaczenie lub predykcja mikrobiologicznej, chemicznej i sensorycznej daty przydatności do spożycia), a także analiz statystycznych (PLS, Partial least square regression), modelowaniu matematycznym krzywych wzrostu mikroorganizmów, interpretacji wyników oraz napisaniu publikacji. Mój udział procentowy wynosi 85%.*

4. **Mikš-Krajnik M., Yuk H.G., Kumar A., Yang Y., Zheng Q., Kim M.J., Ghate Y.S., Yuan W., Pang X.** 2015. Ensuring food security by enhancing microbiological food safety. *COSMOS* 11(1), 1-19. \*

**IF<sup>1</sup> = 0; MNiSW<sup>2</sup> = 0; Liczba cytowań<sup>3</sup> = 0**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu konspektu, poprawie poszczególnych podrozdziałów i całościowemu zharmonizowaniu i edycji publikacji, opracowaniu oprawy graficznej oraz napisaniu streszczenia, wstępu (paragraf numer 1) oraz podrozdziałów (2, 3, 3.7 oraz 4) publikacji. Mój udział procentowy wynosi 60%.*

5. **Mikš-Krajnik M., Feng L.X.J., Bang W.S., Yuk H.G.** 2017. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and natural microbiota on raw salmon fillets using acidic electrolyzed water, ultraviolet light or/and ultrasounds. *Food Control*, 74: 54-60.

**IF<sup>1</sup> = 3.388; MNiSW<sup>2</sup> = 40; Liczba cytowań<sup>3</sup> = 1**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji badań i doświadczeń, wykonaniu analiz sensorycznych, a także analiz statystycznych (analiza wariancji ANOVA) interpretacji wyników oraz napisaniu publikacji. Mój udział procentowy wynosi 85%.*

Sumaryczny(a)

$\sum \text{IF}^1 = 9.414$

$\sum \text{MNiSW}^2 = 130$

$\sum \text{Liczba cytowań}^3 = 13$

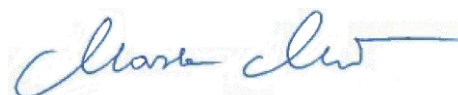
<sup>1</sup> Impact Factor (IF) według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania (Dla publikacji z 2017, dla których IF nie został obliczony podano ostatni aktualny).

<sup>2</sup> Punkty MNiSW - Załącznik do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 stycznia 2017 r.

<sup>3</sup> Liczba cytowań według Web of Science na dzień 3 października 2017 roku.

\* Publikacja nie uwzględniona w załączniku do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 stycznia 2017 r., opublikowana w wydawnictwie World Scientific, w czasopiśmie COSMOS of the Singapore National Academy of Science:

(<http://www.worldscientific.com/page/cosmos/aims-scope>)



## C) OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

### *Wprowadzenie*

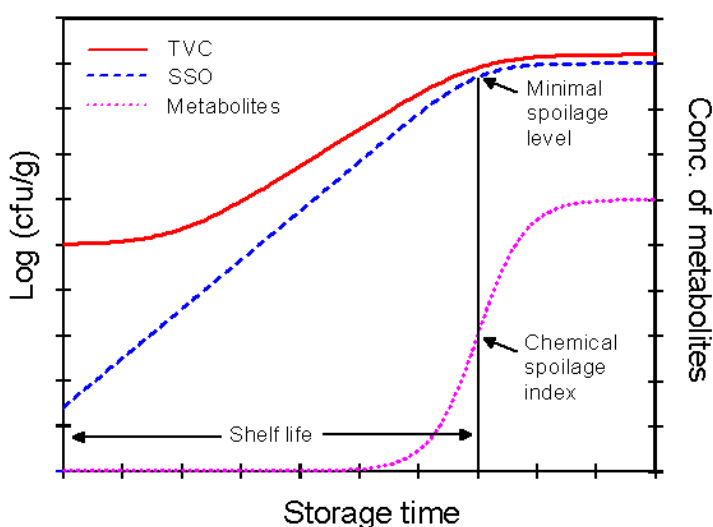
**Bezpieczeństwo żywnościowe** (ang. *food security*) jest pojęciem wieloaspektowym, uwzględniającym cztery główne filary: dostępność żywności (ang. *availability*), dostęp do żywności (ang. *access*), wykorzystanie (ang. *utilization*) oraz stabilność (ang. *stability*) żywności (FAO, 2009). Zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego w rozumieniu światowym wymaga zapewnienia **bezpieczeństwa żywności** (ang. *food safety*) oraz ograniczenia **strat żywności** (ang. *Food Loss and Waste, FLW*) na każdym szczeblu jej dystrybucji w skali zarówno lokalnej jak i globalnej. Według danych Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) z 2011 roku, na świecie blisko jedna trzecia żywności przeznaczony do spożycia dla ludzi jest marnotrawiona lub wyrzucana, co stanowi masę 1.3 mld ton żywności rocznie (FAO, 2011). W połowie 2016 roku, po raz pierwszy opracowano jednolity protokół *Food Loss and Waste Accounting and Reporting Standard (FLW Standard)* pozwalający na mierzenie i zarządzanie stratami żywności (Hanson, 2016).

Integralnym aspektem bezpieczeństwa pomagającym zapobiegać stratom żywności jest właściwe wyznaczenie **okresu trwałości przechowalniczej** (ang. *shelf life evaluation*). Zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 178/2002 z dnia 28 stycznia 2002 roku Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) **żywności niebezpiecznej** nie należy wprowadzać do obrotu handlowego. Przy czym za żywność niebezpieczną uznaje się zarówno żywność szkodliwą dla zdrowia, jak i nienadająca się do spożycia przez ludzi. Prawna odpowiedzialność za bezpieczeństwo i obowiązek określania i walidacji trwałości przechowalniczej leży po stronie producenta żywności. Dyrektywa 2000/13/WE (z dnia 20 marca 2000 z późniejszymi zmianami) określa **datę minimalnej trwałości** produktu spożywczego jako „*datę, do której środek spożywczy zachowuje swoje szczególne właściwości, gdy jest właściwie przechowywany*”. Natomiast, w przypadku żywności łatwo ulegającej zepsuciu i stanowiącej szczególne zagrożenie dla zdrowia ludzi w miejsce daty minimalnej trwałości wprowadzono **termin przydatności do spożycia**.

Zaplanowanie **badania przechowalniczych** (ang. *shelf life studies*) wymaga indywidualnego opracowania ze względu na zróżnicowany skład produktów żywnościowych oraz czynników mających wpływ na trwałość danego produktu (stopień przetworzenia, warunki



przechowywania, rodzaj opakowania). Do oceny stopnia bezpieczeństwa i jakości produktu, pod uwagę należy wziąć potencjalne zagrożenia biologiczne (np. wzrost bakterii *Listeria monocytogenes*), zmiany natury chemicznej, fizycznej i organoleptycznej (EC/DG SANCO, 2008). Dlatego też, zakres badań powinien obejmować **badania mikrobiologiczne, fizykochemiczne** oraz **sensoryczne**, a następnie identyfikację i wyznaczenie wartości krytycznych dla wybranych parametrów bezpieczeństwa i jakości danego produktu spożywczego. Dalgaard (1993) zaproponował teoretyczny model zmian mikrobiologicznych, chemicznych i sensorycznych do opisu procesu zepsucia produktu żywnościowego (**Rys. 1**). Model ten zakładał, że za obniżenie jakości mikrobiologicznej produktu odpowiedzialna jest wąska grupa mikroorganizmów rozwijających się w żywności (z ang. tzw. *specific spoilage organism*, **SSO**), a nie ogólna populacja drobnoustrojów (ang. *total viable count*, **TVC**). SSO powinny charakteryzować się niższym niż TVC zanieczyszczeniem żywności w czasie początkowym ( $N_0$ ), szybszym rozwojem, czyli maksymalną szybkością wzrostu (ang. *maximal growth rate*,  $\mu_{max}$ ) oraz wysoką liczbą/populacją ( $N_{max}$ ) w momencie końca trwałości mikrobiologicznej żywności (określanej jako **minimalny poziom zepsucia**, ang. *minimal spoilage level* lub *minimal shelf life*, **MSL**). Według Dalgaard'a, w punkcie tym, następuje zwiększenie koncentracji metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego. Przekroczenie progu krytycznego stężenia tych metabolitów w fazie nadpowierzchniowej nad powierzchnią produktu określa się jako **chemiczny indeks zepsucia** (ang. *chemical spoilage index*, **CSI**) przechowywanego produktu.



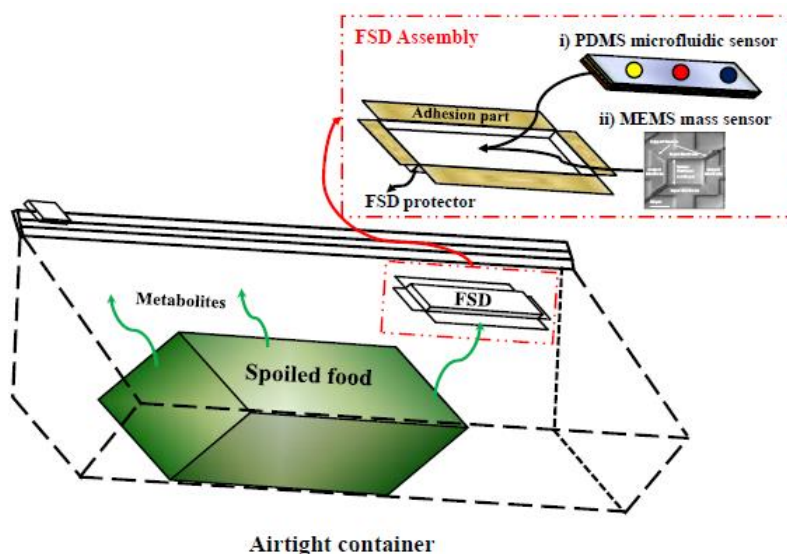
**Rys. 1** Model zmian mikrobiologicznych, chemicznych i sensorycznych zachodzących podczas przechowywania produktu spożywczego (Dalgaard, 1993).

Po sprecyzowaniu wartości krytycznych dla wybranych parametrów, np. mikrobiologicznych lub chemicznych, można przeprowadzić prognozykę przebiegu procesu psucia z zastosowaniem metod modelowania matematycznego (Gospavic et al., 2008, Zwietering, 1990). Prognozowanie stosuje się między innymi do opisu dynamiki rozwoju drobnoustrojów naturalnie obecnych w produktach żywnościowych, jak również sztucznie wprowadzonych mikroorganizmów np. bakterii chorobotwórczych. Przykładem zastosowania mikrobiologii prognostycznej do wyznaczania okresu trwałości przechowalniczej jest metoda oparta na badaniu wzrostu bakterii *Listeria monocytogenes* w produktach gotowych do spożycia (ang. *ready-to-eat*, RTE) (AFSSA, 2008; EC/DG SANCO, 2008). Właściwa **predykcja trwałości przechowalniczej** w znacznym stopniu przyczynia się do ograniczenia strat żywności, na wszystkich etapach łańcucha dostaw żywności. Wyznaczenie korelacji oraz wykorzystanie wybranych wielowymiarowych metod statystycznych umożliwiła wnikliwszą charakterystykę zmian zachodzących podczas przechowywania oraz ustalenie zależności pomiędzy analizowanymi wielkościami.

Metodą zapobiegania stratom przechowalniczym żywności są również działania zmierzające do **przedłużania jej trwałości** poprzez inaktywację mikroorganizmów. Nieprzetworzone produkty pochodzenia zwierzęcego są szczególnie trudne do zakonserwowania bez wywierania negatywnego wpływu na ich jakość sensoryczną czy fizyko-chemiczną. Alternatywę dla klasycznych **metod inaktywacji** drobnoustrojów w żywności stanowi system kombinowanego utrwalania produktów, czyli tzw. **technologia płótkowa** lub **przeszkód** (ang. *hurdle technology*) (Leistner, 2000). W technologii tej następuje zahamowanie rozwoju mikroorganizmów w wyniku synergistycznego działania kilku czynników, które zastosowane pojedynczo nie są równie skuteczne np. temperatura, ciśnienie, pH, aktywność wody ( $a_w$ ) czy potencjał oksydo-redukcyjny (Eh). Praktyczne znaczenie technologii płótkowej polega na redukcji intensywności działania poszczególnych czynników inaktywujących, co znacznie obniża nakłady energetyczne w porównaniu z tradycyjnymi metodami utrwalania, przy jednoczesnym zapewnieniu dłuższej stabilności mikrobiologicznej produktu i wyższej jego jakości.

### Cel i zakres badań

Nadrzędnym celem badań było zaprojektowanie tzw. laboratorium na chipie (ang. *lab-on-a-chip*, **LOC**) do wykrywania **organicznych związków lotnych** (ang. *volatile organic compounds*, **VOCs**) pochodzenia mikrobiologicznego do oznaczania przydatności do spożycia produktów pochodzenia zwierzęcego w czasie rzeczywistym. W projekcie założono opracowanie dwóch typów sensorów (ang. *food spoilage detector*, **FSD**) do detekcji VOCs w fazie nadpowierzchniowej: 1) mikro-urządzenia elektromechanicznego (ang. *Micro-Electro-Mechanical System*, **MEMS**) oraz 2) sensora mikroprzepływowego (ang. *microfluidic sensor*). Zaprojektowanie nowych sensorów FSD (**Rys. 2**) wymagało zidentyfikowania charakterystycznych VOCs oraz ich ilościowego oznaczenia w fazie nadpowierzchniowej nad przechowywanym produktem. W projekcie udział wzięły dwa uniwersytety – Nanyang Technological University (NTU) i National University of Singapore (NUS), odpowiedzialne odpowiednio za zbudowanie nowych sensorów oraz za identyfikację lotnych biomarkerów (VOCs).



**Rys. 2** Schemat obrazujący implementację dwóch rodzajów sensorów FSD (ang. *Food Spoilage Detector*) w formie naklejki na powierzchni opakowania (*Source: Research Proposal*)

Celem naukowym prac stanowiących **Osiągnięcie Naukowe** było wyznaczenie mikrobiologicznego (ang. *specific spoilage organism*, SSO), chemicznego (ang. *chemical spoilage index*, CSI) oraz sensorycznego kryterium zepsucia przechowywanych produktów pochodzenia

zwierzęcego, z jednoczesnym porównywaniem wybranych technik konserwacji tych produktów z zastosowaniem technologii płótkowej. Badania składały się z następujących etapów:

- Opracowanie i optymalizacja metody analizy VOCs w fazie nadpowierzchniowej (ang. *Headspace*, HS) produktów pochodzenia zwierzęcego z zastosowaniem techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (ang. *Solid Phase MicroExtraction*, SPME) oraz chromatografii gazowej (ang. *gas chromatography*, GC) sprzężonej ze spektrometrią masową (ang. *mass spectrometry*, MS) pracujących w trybie mieszanym: skaningu całkowitego widma mas (ang. *Full Scan*) oraz monitorowania wybranych jonów (ang. *selected ion monitoring*, SIM), na przykładzie surowej piersi z kurczaka (*publikacja 1*)
- Identyfikacja i ilościowe oznaczenie lotnych CSI - biomarkerów określających przydatność do spożycia żywności pochodzenia zwierzęcego, na przykładzie surowego łososia norweskiego (*publikacja 2*) oraz surowej piersi z kurczaka (*publikacja 3*) przechowywanych w warunkach tlenowych.
- Oznaczanie trwałości przechowalniczej (terminu przydatności do spożycia) metodami mikrobiologicznymi (SSO) oraz sensorycznymi oraz charakterystyka procesu psucia żywności z wykorzystaniem metod wielowymiarowych analiz statystycznych (*publikacje 2-3*).
- Zastosowanie wybranych technik konserwacji żywności (*publikacja 4*) jako systemu kombinowanego utrwalania produktów, tzw. technologii płótkowej (ang. *hurdle technology*) do przedłużenia trwałości mikrobiologicznej surowego łososia norweskiego (*publikacja 5*).

### *Wyniki i wnioski*

Osiągnięcie przedstawionych powyżej celów naukowych wymagało rozwinięcia lub zaadaptowania metod analitycznych z zakresu mikrobiologii, chromatografii gazowej, analiz sensorycznych oraz wykorzystania metod wielowymiarowych analiz statystycznych.

Prace badawcze rozpoczęto od opracowania: **i**) metody detekcji VOCs w fazie nadpowierzchniowej z zastosowaniem techniki mikro-ekstrakcji do fazy stałej, SPME oraz **ii**) metody chromatograficznej do identyfikacji lotnych markerów przydatności do spożycia, w następujących etapach:

1. **Porównano cztery włókna SPME** o różnej charakterystyce, do ekstrakcji trzech grup VOCs: siarczków, alkoholi oraz krótkołańcuchowych, wolnych kwasów tłuszczowych FFAs (ang. *free fatty acids*):

- ✓ Niepolarne włókno PDMS (polidimetylosiloksan) 100µm
- ✓ Polarne włókno PA (poliakryl) 85µm
- ✓ Bipolarne włókno DVB/CAR/PDMS (polidiwinylbenzen/ carboxen/ polidimetylosiloksan) 50/30µm
- ✓ Bipolarne włókno CAR/PDMS (carboxen/ polidimetylosiloksan) 85µm

Wszystkie testowane włókna SPME pozwoliły na wykrycie wybranych VOCs, dlatego też, najbardziej uniwersalne i stabilne włókno PDMS zostało zastosowane do dalszych badań.

2. **Wyznaczono optymalne parametry ekstrakcji VOCs techniką SPME** (z użyciem włókna PDMS) dla trzech parametrów: czasu ekstrakcji VOCs (5-90 min) przy stałej temperaturze 50°C, temperatury ekstrakcji (30-90°C) przy stałym czasie ekstrakcji 15 min, oraz czasu desorpcji VOCs (1-3 min) przy stałej temperaturze 200°C. Za optymalne parametry uznano ekstrakcję VOCs przez 15 min w temperaturze 50°C a następnie 3 min desorpcję.
3. **Opracowano metodę chromatograficzną** z zastosowaniem spektrometru masowego (MS) pracującego w trybie mieszanym: skaningu całkowitego widma mas (*Full Scan*) oraz monitorowania wybranych jonów (SIM). Skanowanie umożliwiło identyfikację pików VOCs przez porównanie widm masowych z bazą danych NIST (ang. *National Institute of Standards and Technology*) oraz ze standardami zewnętrznymi. W celu zwiększenia

czułości metody zastosowano tryb SIM dla wybranych jonów o masie charakterystycznej (m/z) dla najczęściej występujących 22 pików VOCs. Tryby *Full Scan* oraz SIM zostały zintegrowane w opracowanej metodzie chromatograficznej (tzw. **FASST**, ang. *Fast Automated Scan/SIM Type*).

4. **Przeprowadzono wstępne badania przechowalnicze** surowej piersi z kurczaka w temperaturze 21°C (symulującej temperaturę pokojową) w warunkach tlenowych (tzw. badanie przyśpieszone, ang. *accelerated shelf life test*). W czasie przechowywania monitorowano wzrost ogólnej populacji drobnoustrojów oraz profil VOCs w fazie nadpowierzchniowej. Wyniki badań poddano analizie statystycznej wykorzystując: PCA (*Principal Component Analysis*) oraz współczynnik korelacji Pearson'a w celu zidentyfikowania najważniejszych związków powstających podczas przechowywania. Stwierdzono, że psucie piersi z kurczaka to prawdopodobnie proces etapowy, na który składają się z dwa następujące po sobie szlaki metaboliczne: glikolityczny i proteolityczny, prowadzące do powstania odpowiednio alkoholi, kwasu octowego oraz lotnych siarczków.

Przedstawione wyniki na przykładzie surowej piersi z kurczaka opisano w publikacji:

- ✓ **Mikš-Krajnik M.**, Yoon Y.J., Yuk H.G. 2015. Detection of volatile organic compounds as markers of chicken breast spoilage using HS-SPME-GC/MS-FASST. *Food Science and Biotechnology* 24(1): 361-372.

Równoległe opracowano analogiczne metody analizy VOCs dla surowego łososia norweskiego, jednak wyniki tych badań nie zostały opublikowane. Rozwiniętą metodę FASST dla łososia opisano w publikacji:

- ✓ **Mikš-Krajnik M.**, Yoon Y.J., Ukuku D.O., Yuk H.G. 2016. Volatile chemical spoilage indexes of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored under aerobic condition in relation to microbiological and sensory shelf lives. *Food Microbiology* 53: 182-191.

Następnie właściwe **badania przechowalnicze** zostały przeprowadzone dla surowej piersi z kurczaka oraz surowego łososia norweskiego, dla trzech wybranych temperatur przechowywania tlenowego: 4, 10 oraz 21°C. Badania wykonano w różnych temperaturach, gdyż warunki przechowywania determinują wzrost różnych grup mikroorganizmów, co z kolei wywiera wpływ na powstające związki lotne (VOCs).

W czasie eksperymentów przechowalniczych monitorowano:

1. wzrost mikroorganizmów naturalnie występujących w surowym mięsie z kurczaka (siedem grup) oraz w filecie z łososia norweskiego (osiem grup), **w celu zidentyfikowania charakterystycznych SSO**, których dynamikę wzrostu wykorzystano do **wyznaczenia nowego mikrobiologicznego kryterium okresu trwałości produktów – minimalnego poziomu zepsucia produktu** (ang. *minimal shelf life*, **MSL**). Badania objęły następujące grupy mikroorganizmów:
  - ✓ Ogólną liczbę drobnoustrojów (ang. *total viable count*, **TVC**)
  - ✓ Psychrotrofy
  - ✓ *Pseudomonas* spp.
  - ✓ Bakterie fermentacji mlekowej
  - ✓ Bakterie z grupy coli
  - ✓ *Brochothrix thermosphacta*
  - ✓ Bakterie redukujące H<sub>2</sub>S (podobne do *Shewanella putrefaciens*)
  - ✓ Drożdże i pleśnie – oznaczono tylko dla łososia norweskiego;
2. **zmiany sensoryczne** (dla wybranych deskryptorów jakościowych: koloru, zapachu i tekstury), w celu porównania MSL z akceptacją (odrzuconiem) jakości sensorycznej przechowywanych produktów (**indeksem sensorycznym**, ang. *sensory index*, **SI**);
3. profile VOCs w fazie nadpowierzchniowej, w celu **zidentyfikowania charakterystycznych CSIs** dla wybranych temperatur przechowywania, a następnie ilościowo oznaczono wybrane CSIs w fazie nadpowierzchniowej przechowywanych produktów.

Wyniki analiz mikrobiologicznych pozwoliły na opracowanie matematycznych modeli wzrostu wybranych grup mikroorganizmów z zastosowaniem modelu Gompertza (Zwietering, 1990).

Wyznaczono następujące parametry wzrostu:

- ✓  $N_0$  - zanieczyszczenie żywności w czasie początkowym [log CFU/g],
- ✓  $\mu_{\max}$  - maksymalną szybkość wzrostu [1/d],
- ✓  $N_{\max}$  – maksymalne zanieczyszczenie żywności [log CFU/g],

- ✓  $S_{val}$  - zanieczyszczenie żywności w czasie minimalnego zepsucia produktu **MSL** przy kryterium referencyjnym  $TVC = 7.0 \log CFU/g$  [ $\log CFU/g$ ] zgodnie z Institute of Food Science and Technology (IFST, 1999).

Do selekcji SSOs zastosowano następujące kryteria: niskie  $N_0$ , wysokie  $\mu_{max}$  oraz wysokie  $N_{max}$  (Dalgaard, 1993). Na tej podstawie, **zidentyfikowano potencjalne SSOs** dla surowej piersi z kurczaka (*Pseudomonas* spp. lub *B. thermosphacta*) oraz dla surowego łososia norweskiego (*Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* oraz bakterie redukujące  $H_2S$ ). Zgodnie z teorią, wzrost wybranego SSO można wykorzystać do oceny jakości mikrobiologicznej danego produktu podczas przechowywania oraz zastosować jako dodatkowe kryterium MSL (Gram & Dalgaard, 2002; Gospavic *et al.*, 2008). Teoretycznie również, wybrana grupa mikroorganizmów, która mogłaby zostać zastosowana jako nowe mikrobiologiczne kryterium MSL, musi osiągać zawsze ten sam poziom zanieczyszczenia [ $\log CFU/g$ ] w momencie zepsucia produktu, bez względu na temperaturę jego przechowywania. Dlatego też, porównano wyznaczone wartości  $S_{val}$  w 4, 10 i 22°C dla wybranych SSOs w punkcie MSL (gdy  $TVC = 7.0 \log CFU/g$ ). W przypadku piersi z kurczaka, nie zaobserwowano istotnych różnic ( $p \leq 0.05$ ) pomiędzy  $S_{val}$  dla *Pseudomonas* spp. ( $\approx 7.0 \log CFU/g$ ), jednak dla *B. thermosphacta* wartości  $S_{val}$  wahały się w granicach 5.0-5.6  $\log CFU/g$ . W przypadku surowego łososia wszystkie SSOs: *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* oraz bakterie redukujące  $H_2S$  osiągnęły poziom  $S_{val}$  6.5  $\log CFU/g$  w momencie zepsucia. Dlatego też, **wyznaczono okresy przydatności dla nowych mikrobiologicznych kryteriów MSL** dla piersi z kurczaka (przy *Pseudomonas* spp. = 7.0  $\log CFU/g$  oraz *B. thermosphacta* = 5.0  $\log CFU/g$ ) oraz dla surowego łososia norweskiego (przy *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* oraz bakterie redukujące  $H_2S$  = 6.5  $\log CFU/g$ ). Wykazano, że ***Pseudomonas* spp. może być uważany za modelowy SSO oraz nowe kryterium MSL** do predykcji okresu przydatności obydwu produktów przechowywanych w warunkach tlenowych.

Następnie porównano dane mikrobiologiczne dla wybranych grup mikroorganizmów z wynikami analizy sensorycznej, zmianami wartości indeksu sensorycznego (SI) oraz deskryptorów jakości: koloru, zapachu i tekstury. Zaobserwowano, że zmiany zapachu miały kluczowy wpływ na SI przechowywanych produktów. W momencie sensorycznego odrzucenia analizowanych produktów (gdy  $SI \leq 2.0$ ), poziom *Pseudomonas* spp. osiągnął około 7.0  $\log CFU/g$ .



**Identyfikacja i ilościowe oznaczenie lotnych CSI** zostały poprzedzone analizami wyników, z badań przechowalniczych, uzyskanych w oparciu o wielowymiarowe metody statystyczne. Zastosowano hierarchiczną analizę skupień (HCA, ang. *hierarchical cluster analysis*) w celu zidentyfikowania VOCs, które różnicują świeże i zepsute próbki łososia norweskiego. Dodatkowo skorelowano (korelacja Pearson'a) krzywe wzrostu z profilami VOCs we wszystkich temperaturach przechowywania osobno (4, 10 i 22°C) oraz razem.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najlepszymi **CSI dla surowego łososia norweskiego** przechowywanego w warunkach tlenowych były następujące VOCs: trimetyloamina (TMA), etanol (EtOH), 3-metylo-1-butanol (3M-1But), acetoina, kwas octowy (C<sub>2</sub>) oraz 2,3-butanediol (2,3-But). Wybrane **CSI oznaczono ilościowo** w fazie nadpowierzchniowej stosując standardowe krzywe dodatku wzorców wewnętrznych (ang. *standard addition method*). Regresja liniowa pomiędzy ilością CSI a TVC była istotna statystycznie dla metabolitów: TMA oraz EtOH. Rezultaty analiz przeprowadzonych dla wyników badań przechowalniczych **surowej piersi z kurczaka** ujawniły, że najlepszymi **CSI** były: EtOH, 3M-1But oraz C<sub>2</sub>. Metabolity te zostały oznaczone ilościowo w fazie nadpowierzchniowej, a 3M-1But uzyskał najwyższą, istotnie statystyczną korelację ze wzrostem populacji TVC.

**Regresja metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS, *Partial least square regression*)** jest kombinacją analizy głównych składowych (PCA) oraz wielokrotnej regresji liniowej, w której prognozuje się wartości zmiennych zależnych, używając zmiennych niezależnych. **Analiza PLS dla surowego łososia** ujawniła, że alkohole, aldehydy, TMA, 2,3-But oraz acetoina były najmocniej skorelowane z oznaczonymi mikroorganizmami. Wzrost bakterii fermentacji mlekowej można powiązać z powstawaniem alkoholi, FFAs, EtOH oraz C<sub>2</sub>. Natomiast, wzrost *Pseudomonas* spp. (SSO) był skorelowany z ogółem VOCs, reprezentowanymi głównie przez EtOH, TMA oraz 2,3-But. Na podstawie **PLS dla surowej piersi z kurczaka** stwierdzono, że dominujące mikroorganizmy, w tym TVC i *Pseudomonas* spp. skorelowane były z ogółem syntetyzowanych VOCs. Natomiast, bakterie fermentacji mlekowej oraz *B. thermosphacta* wykazały bardzo wysoką korelację z 3M-1But.

Przedstawione wyniki opisano w publikacjach:

- ✓ **Mikš-Krajnik M.**, Yoon Y.J., Ukuku D.O., Yuk H.G. 2016. Volatile chemical spoilage indexes of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored under aerobic condition in relation to microbiological and sensory shelf lives. *Food Microbiology* 53: 182-191.
- ✓ **Mikš-Krajnik M.**, Yoon Y.J., Ukuku D.O., Yuk H.G. 2016. Identification and quantification of volatile biomarkers associated with growth of microorganisms in aerobically spoiled chicken meat. *Journal of Food Science* 81(8): M2006-M2014.

W kolejnym etapie badań, skupiono się na możliwościach wykorzystania wybranych technik konserwacji żywności w celu przedłużenia trwałości mikrobiologicznej produktów żywnościowych. W tym celu, scharakteryzowano dostępne, **innowacyjne technologie termiczne** (w tym: ogrzewanie omowe, ang. *ohmic (OH) heating*, ogrzewanie mikrofalowe i za pomocą fal radiowych, ang. *microwave (MW) and radio frequency (RF) heating*, ogrzewanie przy użyciu podczerwieni, ang. *infrared (IR) heating* oraz sterylizacje przy wysokim ciśnieniu, ang. *high-pressure thermal sterilization, HPTS*) a także **technologie nietermiczne** (włączając: pulsacyjne pola elektryczne, ang. *pulsed electric fields, PEF*, zimną plazmę, ang. *cold plasma, CP*, technikę wysokich ciśnień, ang. *high pressure processing, HPP*, inaktywację fotodynamiczną, ang. *photodynamic inactivation, PDI*, naturalne konserwanty, ang. *natural preservatives*, radiacyjne utrwalanie, ang. *irradiation* oraz nowoczesne technologie pakowania żywności). Szczególny nacisk położono na mechanizm inaktywacji mikroorganizmów przy zastosowaniu tych technologii, a także na ich efektywność w różnych produktach żywnościowych, w celu redukcji i kontroli zagrożeń mikrobiologicznych.

Wybrane technologie nietermiczne o wzajemnie uzupełniającym się mechanizmie inaktywacji mikroorganizmów zostały wybrane do dalszych eksperymentów z zastosowaniem **tzw. technologii plotkowej** (ang. *hurdle technology*). Celem tego etapu badań było dobranie takiej kombinacji technik konserwacji, która zapewniłaby redukcję liczby mikroorganizmów, zarówno naturalnie występujących drobnoustrojów, jak również sztucznie wprowadzonych bakterii chorobotwórczych (*Listeria monocytogenes*) przy jednoczesnym zachowaniu jakości surowego łososia norweskiego.

Do przedłużenia trwałości mikrobiologicznej zastosowano zjonizowaną wodę o odczynie kwaśnym (ang. *acidified electrolyzed water, AEW*), promieniowanie ultrafioletowe (ang.

*ultraviolet, UV*) oraz ultradźwięki (ang. *ultrasounds, US*) pojedynczo i w kombinacjach. **Najwyższą skuteczność** w redukcji liczby bakterii *L. monocytogenes* oraz drobnoustrojów naturalnie występujących (TVC, bakterii z grupy coli oraz drożdży i pleśni) **uzyskano dla kombinacji technologii UV+US oraz UV+US+AEW**. Stwierdzono jednocześnie, że wybrane kombinacje nie miały istotnego wpływu na teksturę fileta z surowego łososia poddanego utrwalaniu. Do oceny zmiany barwy zastosowano system CIE L\*a\*b\*, który pozwala na określenie jasności (L\*, w skali czarny-biały), chromatyczności (a\*, w skali czerwony-zielony, b\*, w skali żółty-niebieski) oraz obliczono indeks wybielenia (ang. *whiteness index, WI*). Filety z surowego łososia poddane obróbce UV+US oraz UV+US+AEW były znacznie jaśniejsze (L\* oraz WI) i wykazały obniżone wartości a\* i b\* w porównaniu z próbką kontrolną. Zastosowana technologia płatkowa zmieniła również akceptację sensoryczną surowego łososia norweskiego, obniżając szczególnie zapach i kolor jego tkanki.

Przedstawione wyniki opisano w publikacjach:

- ✓ **Mikš-Krajnik M.**, Yuk H.G., Kumar A., Yang Y., Zheng Q., Kim M.J., Ghate Y.S., Yuan W., Pang X. 2015. Ensuring food security by enhancing microbiological food safety. *COSMOS* 11(1), 1-19.
- ✓ **Mikš-Krajnik M.**, Feng L.X.J., Bang W.S., Yuk H.G. 2017. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and natural microbiota on raw salmon fillets using acidic electrolyzed water, ultraviolet light or/and ultrasounds. *Food Control*, 74: 54-60.

### **Podsumowanie**

Wyznaczanie okresu trwałości przechowalniczej żywności nieprzetworzonej, integrującego zmiany o naturze chemicznej, mikrobiologicznej oraz sensorycznej, jest złożonym problemem naukowym, co przedstawiłam w omówionych publikacjach, wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia. W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowałam bakterie SSO (*specific spoilage organism*) dla surowych piersi z kurczaka oraz łososia norweskiego przechowywanych w warunkach tlenowych. Ponadto, podjęłam się próby nie tylko identyfikacji i oznaczenia ilościowego charakterystycznych lotnych biomarkerów zepsucia, określanych również terminem chemiczny indeks zepsucia (ang. *chemical spoilage index, CSI*), ale również holistycznego zintegrowania wybranych kryteriów mikrobiologicznych, chemicznych i

sensorycznych w celu wyznaczenia jednoznacznego terminu przydatności do spożycia dla wybranych produktów. Opublikowane wyniki badań poszerzają aktualny stan wiedzy na temat charakterystyki procesu psucia żywności zarówno od strony mikrobiologicznej (identyfikacja SSO), jak i chemicznej (identyfikacja CSI). W kolejnych etapach projektu zidentyfikowane lotne biomarkery CSI, będą zastosowane jako chemiczne wskaźniki w opracowywanych sensorach FSD (*food spoilage detector*) do detekcji VOCs (ang. *volatile organic compounds*) w fazie nadpowierzchniowej. W przyszłości, pozwoli to na monitorowanie zmian jakości produktów łatwo ulegających zepsuciu w czasie rzeczywistym w zmiennych warunkach przechowywania.

W ostatnim etapie badań, przyjęto strategię przedłużenia trwałości przechowalniczej surowego łososia norweskiego, poprzez zastosowanie wybranych technik konserwacji żywności jako systemu kombinowanego utrwalania produktów, tzw. technologii płotkowej (ang. *hurdle technology*).

**Literatura**

- AFSSA, 2008. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Technical Guidance Document - On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, Ver. 2, Nov. 2008
- Dalgaard, P., 1993. Evaluation and prediction of microbial fish spoilage. In: Technological Laboratory, Ministry of Fisheries, Denmark, Lyngby, pp. 1-169.
- Dyrektywa 2000/13/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 marca 2000 r. w sprawie zbliżenia ustawodawstw Państw Członkowskich w zakresie etykietowania, prezentacji i reklamy środków spożywczych (Dz.U. L 109 z 6.5.2000)
- EC/DG SANCO, 2008. Dyrekcja Generalna ds. Zdrowia i Konsumentów / Directorate General for Health and Consumer Affairs. Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. SANCO/1628/2008 ver. 9.3 (26112008).
- FAO, 2011. Global food losses and food waste – extent, causes and prevention, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Gospavic, R., Kreyenschmidt, J., Bruckner, S., Popov, V., Haque, N., 2008. Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. Int. J. Food Microbiol. 127, 290-297.
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. Curr. Opin. Biotechnol. 13, 262-266.
- Hanson, C., Lipinski, B., Robertson, K., Dias, D., Gavilan, I., Gréverath, P., Ritter, S., Fonseca, J., VanOtterdijk, R., Timmermans, T., Lomax, J., O'Connor, C., Dawe, A., Swannell, R., Berger, V., Reddy, M., Somogyi, D., Tran, B., Leach, B., Quested, T., 2016. The Protocol for the Food Loss and Waste Accounting and Reporting Standard (FLW Standard). Global Green Growth Forum (3GF) 2016 Summit, Copenhagen, Denmark, pp. 1-160.
- HLPE, 2014. Food losses and waste in the context of sustainable food systems, Rome: Committee on World Food Security, The High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition, pp.1-117.
- IFST, 1999. In: Bell C. (Ed.), Development and use of microbiological criteria for foods, The Institute of Food Science and Technology (UK).

Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 181-186.

Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiającego ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołującego Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiającego procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (Dz.U. L 31, str. 1)

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van 'T Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875-1881.

## V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Moje zainteresowania i pasje naukowe ukierunkowały główne nurty podejmowanej pracy badawczej obejmujące problemy i zagadnienia z zakresu mikrobiologii i biotechnologii żywności. Z uwagi na szeroki obszar badań, a także kompleksowość i różnorodność zastosowanych metod badawczych większość prac i projektów realizowałam w zespołach naukowych.

Początkowo, w latach 2005-2012, moje badania naukowe wykonane w ramach pracy doktorskiej były prowadzone w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, UWM w Olsztynie. Kolejny etap badań zrealizowałam podczas stażu naukowego w Food Science and Technology (FST) Programme, c/o Department of Chemistry, National University of Singapore (NUS) w Singapurze, w zespole doktora Hyun-Gyun Yuk'a, specjalisty w zakresie bezpieczeństwa żywności.

Realizowane przeze mnie badania skupiają się wokół następujących zagadnień:

- A) Molekularne metody detekcji mikroorganizmów (LAMP, real-time PCR, FISH)
- B) Fermentacja żywności i organiczne związki lotne (bakterie fermentacji mlekowej i propionowej)
- C) Inaktywacja mikroorganizmów (LED, czynniki utrwalające, powłoki do żywności)
- D) Inżynieria żywności (modelowanie matematyczne, kompostowanie, ultradźwięki)

### A) Molekularne metody detekcji mikroorganizmów

Na początku mojej pracy naukowej zainteresowały mnie techniki mikroskopii fluorescencyjnej do analizy stanu fizjologicznego mikroorganizmów, co zaowocowało pracą przeglądową (Zał. 3, I.D, 2) oraz pierwszym projektem badawczym (MNiSW, N312 081 32/4016) z tego zakresu, który realizowałam w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, UWM w Olsztynie (Zał. 3, I.I, 8). W moich badaniach zastosowałam metody barwienia fluorescencyjnego do oceny stopnia permeabilizacji błony cytoplazmatycznej komórek bakterii, a także analizy ich wewnątrzkomórkowej aktywności enzymatycznej (aktywności niespecyficznych esteraz) podczas fermentacji. W kolejnym etapie mojej pracy naukowej, skupiłam się na technice fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, ang. *fluorescent in situ hybridization*) do detekcji bakterii fermentacji mlekowej i propionowej w ko-kulturach. W 2009 roku otrzymałam grant promotorski (MNiSW, N N312 204736) na realizację tego projektu (Zał. 3, I.I, 6), w ramach którego zaprojektowałam

specyficzne, molekularne sondy oligonukleotydowe 16S rRNA dla bakterii *Propionibacterium freudenreichi* z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych. Wyniki uzyskane w toku tych badań zostały uwzględnione w mojej pracy doktorskiej, a następnie opublikowane (Zał. 3, I.A, 7). Dzięki doświadczeniu wyniesionemu z tego projektu, zostałam pomysłodawcą i współautorem kolejnego projektu własnego (MNiSW, No N N312 491340), który zakładał wykorzystanie techniki FISH do wykrywania obecności *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes* w żywności pochodzenia zwierzęcego (Zał. 3, I.I, 3).

W 2013 roku rozpoczęłam staż naukowy na Uniwersytecie Narodowym w Singapurze (NUS), gdzie sprawowałam opiekę naukową nad kilkoma projektami z zakresu optymalizacji i walidacji molekularnych metod detekcji mikroorganizmów chorobotwórczych. Mój współdziałanie zostało udokumentowane trzema publikacjami (Zał. 3, I.A, 8; 12 i 15) dotyczącymi zastosowania metody *Real-Time* PCR do detekcji *Salmonella* spp. w kombinacji z wybranymi fizycznymi metodami koncentracji komórek (immuno-magnetyczna separacją komórek, ang. *Immuno-Magnetic Separation*, IMS, oraz wirowaniem). Ponieważ bakterie chorobotwórcze występują w żywności w niewielkiej ilości zazwyczaj w stanie obniżonej aktywności fizjologicznej, na skutek działania czynników technologicznych (jak podwyższona temperatura czy ciśnienie itp.), cykl badań rozpoczęto od doboru podłoża namnażającego odpowiednie do resuscytacji sub-letalnie uszkodzonych komórek *Salmonella* spp. W kolejnych etapach zoptymalizowano i zwalidowano metodę *Real-Time* PCR do oznaczania bakterii *Salmonella* spp., w tym komórek charakteryzujących się różnym stanem fizjologicznym: aktywnych i sub-letalnie uszkodzonych, w surowym mięsie kaczki (Zał. 3, I.A, 8) oraz kiełkach fasoli mung (Zał. 3, I.A, 12 i 15).

Jestem również współautorem dwóch publikacji (Zał. 3, I.A, 16 i 17) dotyczących detekcji bakterii techniką izotermalnej amplifikacji DNA za pośrednictwem pętli (ang. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*, LAMP). W pierwszej pracy opisano walidację metody LAMP do oznaczania bakterii *Salmonella* spp w surowym mięsie kaczki, kiełkach fasoli mung oraz kulkach rybnych. Druga publikacja opisuje zastosowanie techniki LAMP i jej walidację do oznaczania bakterii *L. monocytogenes* na powierzchniach przeznaczonych do kontaktu z żywnością. Ocenie poddano wpływ organicznego odcieku z łososia norweskiego wędzonego na zimno na skuteczność techniki LAMP do detekcji aktywnych komórek *L. monocytogenes* w liczbie  $10^0$ - $10^2$  CFU/100cm<sup>2</sup>.



## B) Fermentacja i organiczne związki lotne

Fermentacja prowadzona przez bakterie fermentacji mlekowej i propionowej w produktach mleczarskich, szczególnie w fermentowanym mleku i serach dojrzewających była tematem przewodnim projektu badawczego (MNiSW, N312 081 32/4016, Zał. 3, I.I, 8) oraz i pięciu moich publikacji naukowych (Zał. 3, I.A, 1; 2; 3 i 5; oraz I.D, 3). W pracach tych skupiono się na wpływie stanu fizjologicznego oraz aktywności metabolicznej zastosowanych kultur starterowych (głównie *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp.) na syntezę lotnych związków organicznych (ang. *Volatile Organic Compounds*, VOCs). Wyniki moich badań posłużyły do opracowania hipotezy badawczej, która stała się podstawą do sformułowania przeze mnie kolejnego projektu badawczego zakładającego ocenę zmian bioróżnorodności drobnoustrojów techniką PCR/DGGE oraz profili związków lotnych w serach typu szwajcarsko-holenderskiego w aspekcie sezonowości (MNiSW, No N N312 484140, Zał. 3, I.I, 4). Wyniki badań pochodzące z tego projektu zostały zaprezentowane w postaci dwóch posterów na międzynarodowej konferencji naukowej (Zał. 3, II.B, 7 i 8) i jednej publikacji (Zał. 3, I.A, 4).

Zainteresowania bakteriami fermentacji mlekowej kontynuowałam również podczas stażu naukowego w NUS w Singapurze. Przedmiotem badań był wpływ m.in. bakterii fermentacji mlekowej na syntezę VOCs oraz dynamikę psucia się produktów pochodzenia zwierzęcego, które zostały opublikowane i stanowią podstawę dokumentacji wskazanego osiągnięcia naukowego.

Przez kolejne dwa lata kontynuowałam prace nad zastosowaniem m.in. bakterii fermentacji mlekowej i propionowej w browarnictwie oraz opracowywaniem nowych fermentowanych produktów w Laboratorium Badawczym Carlsberga w Kopenhadze (*Carlsberg Research Laboratory*, CRL), gdzie kierowałam grupą naukowców i projektem finansowanym przez Fundację Carlsberga, (ang. *Carlsberg Foundation*, No CF14-0450, Zał. 3, I.I, 1). W czasie projektu odpowiedzialna byłam również za zorganizowanie:

- i) kolekcji szczepów bakterii (posiadających status GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*) i europejski status QPS (ang. *Qualified Presumption of Safety*),
- ii) platformy do wysoko wydajnego skriningu bakterii HTS (ang. *High-Throughput Screening*),
- iii) platformy fermentacyjnej do powiększenia skali bio-procesów (w sumie 10 bioreaktorów w skali od 1 do 12 litrów),

- iv) oraz bioinformatycznej bazy danych opartej o analizę fenotypową oraz badania asocjacyjne całego genomu dla bakterii fermentacji mlekowej i propionowej (ang. *Genotype-Phenotype Association Study* lub GWAS, ang. *Genom-Wide Association Study*).

Wynikiem naszej pracy jest m.in. rozdział w książce poświęcony zastosowaniu inżynierii genetycznej w syntezie mikrobiologicznej związków smakowo-zapachowych (Zał. 3, I.D, 4) oraz prezentacja analizy GWAS na międzynarodowej konferencji (Zał. 3, I.B, 1).

### C) Utrwalanie produktów spożywczych

Kolejną część mojego dorobku naukowego stanowią prace traktujące o nietermicznych metodach utrwalania produktów spożywczych. W czasie stażu w NUS miałam okazję sprawować opiekę naukową nad projektem dotyczącym zastosowania wysokiej intensywności niebieskiego 405 nm światła LED (ang. *light emitting diode*) do inaktywacji bakterii chorobotwórczych. Celem projektu było wyjaśnienie mechanizmu inaktywacji gram-dodatnich i gram-ujemnych drobnoustrojów na skutek ekspozycji ich komórek na działanie światła 405 nm LED. Rezultatem współpracy były dwie publikacje naukowe (Zał. 3, I.A, 11 i 13) i jeden komunikat (Zał. 3, I.K, 3).

Innym obszarem badawczym w dziedzinie konserwacji, w którym uczestniczyłam, było zastosowanie środków dezynfekujących do odkażania produktów spożywczych i powierzchni przeznaczonych do kontaktu z żywnością. Pierwszy projekt, mający na celu opracowanie metody dezynfekcji surowej rzepy został wykonany na zlecenie i we współpracy z Agri-Food & Veterinary Authority of Singapore (AVA), Post-Harvest Technology Department w Singapurze (Zał. 3, I.A, 9). Drugi projekt dotyczył inaktywacji biofilmów *Salmonella* spp. na powierzchni stali nierdzewnej pod wpływem działania środków dezynfekujących na bazie chloru (Zał. 3, I.A, 14).

Ponadto, współpracowałam również z innym zespołem badawczym, kierowanym przez Dr. Hongshun Yang, w którym prace badawcze skupiały się na zastosowaniu jadalnej powłoki do przedłużania trwałości filetów ryby. Powłokę tę uzyskano z zastosowaniem żelatyny wyekstrahowanej z rybich ości i skóry, jako substancji zestalającej z dodatkiem związków polifenolowych wyekstrahowanych z herbaty, jako środka o działaniu antymikrobiologicznym (Zał. 3, I.A, 18).

**D) Inżynieria żywności**

Moje zainteresowania naukowe nie koncentrują się wyłącznie na mikrobiologii żywności. Podczas trwania studiów doktoranckich, podjęłam się współpracy z mgr Arkadiuszem Ratajskim w projekcie dotyczącym oznaczania rozdziału wielkości cząstek pomidora (ang. *particle size distribution*, PSD) w koncentracji pomidorowym z zastosowaniem ultradźwięków, prowadzonym pod kierunkiem Prof. Ireneusza Białobrzewskiego z Katedry Inżynierii Systemów, Wydziału Nauk Technicznych (UWM). Zaproponowałam mikroskopową metodę oznaczania PSD w rozcieńczonym koncentracji pomidorowym jako metodą referencyjną do pomiarów ultradźwiękowych. Miałam również okazję współpracować nad interpretacją i opisem wyników tej pracy (Zał. 3, I.A, 6).

Rozpoczętą współpracę kontynuowałam podczas mojego pobytu w Singapurze, co zaowocowało kolejną pracą (Zał. 3, I.A, 10) z zakresu modelowania matematycznego procesu kompostowania mieszaniny osadów ściekowych ze słomą. Mój wkład polegał na konsultacji przy budowaniu modelu matematycznego procesu kompostowania, interpretacji wyników oraz całościowym opisie zachodzących zmian mikrobiologicznych oraz biochemicznych.

## VI. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWO-BADAWCZEGO

Mój dotychczasowy dorobek publikacyjny obejmuje:

- ✓ prace twórcze: **27** (w tym 22 opublikowano w czasopismach z IF)
- ✓ komunikaty naukowe (postery i referaty): **35** (w tym 24 zaprezentowanych osobiście)
- ✓ opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyzy: **27**

Wartość naukowa dorobku publikacyjnego do dnia 3 października 2017 roku wynosi:

**Punkty MNiSW: 674**

**Sumaryczny Impact Factor (IF): 49.136**

*(według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania)*

**Liczba Cytowań 103**

**Indeks Hirscha: 6**

*(według bazy Web of Science, WoS)*

W czasie pracy naukowej brałam udział w realizacji siedmiu **grantów badawczych** finansowanych w Polsce (KBN), Singapurze (A\*STAR / SERC) i w Danii (Carlsberg Foundation). Ponadto, uczestniczyłam aktywnie w przygotowaniu wniosków do **pięciu projektów badawczych**, a w dwóch zostałam **kierownikiem projektu**. Po stronie polskiej, uczestniczyłam w międzynarodowym projekcie dydaktycznym Modular and Portable Virtual Dairy Simulator. Koordynowałam również prace nad czterema projektami we współpracy w przemyśle i instytucjami rządowymi.

Do ciągłego podnoszenia moich kwalifikacji przyczyniają się **międzynarodowe staże i wyjazdy naukowe** (2.5 roku w Singapurze, 2 lata w Danii), liczne **szkolenia, warsztaty i konferencje**, w których biorę czynny udział. Wizyty w wiodących zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych przyczyniły się do ukierunkowania pracy naukowo-badawczej, ale przede wszystkim dały podstawę do samodzielnego prowadzenia warsztatu badawczego, zarówno w zakresie badań naukowych, komercjalizacji wyników jak i wdrażania gotowych produktów.

## TABELARYCZNY WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

Kategoria publikacji	Liczba publikacji	IF <sup>1</sup>	Punkty MNiSW <sup>2</sup> zgodnie z	
			rokiem wydania	aktualnym komunikatem <sup>3</sup>
<b>Oryginalne prace twórcze przed uzyskaniem stopnia doktora</b>				
Publikacje w czasopismach recenzowanych znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	3	1.945	45	50
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	2	-	19	29
<b>Razem (przed uzyskaniem stopnia doktora)</b>	<b>5</b>	<b>1.945</b>	<b>64</b>	<b>79</b>
<b>Oryginalne prace twórcze po uzyskaniu stopnia doktora</b>				
Publikacje w czasopismach recenzowanych znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	19	47.191	595	650
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	3	-	15	15
Prace niepublikowane – sprawozdania, raporty, ekspertyzy	27	-	-	-
<b>Razem (po uzyskaniu stopnia doktora)</b>	<b>49</b>	<b>47.191</b>	<b>610</b>	<b>665</b>
<b>Referaty, komunikaty i doniesienia naukowe na konferencjach krajowych i międzynarodowych</b>				
Przed uzyskaniem stopnia doktora (doniesienia ustne)	6	-	-	-
Przed uzyskaniem stopnia doktora (postery)	9	-	-	-
Po uzyskaniu stopnia doktora (doniesienia ustne)	10	-	-	-
Po uzyskaniu stopnia doktora (postery)	10	-	-	-
<b>Razem (doniesienia naukowe)</b>	<b>35</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Razem</b>	<b>89</b>	<b>49.136</b>	<b>674</b>	<b>744</b>

Gdzie:

- <sup>1</sup> Impact Factor (IF) według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania (Dla publikacji z 2017, dla których IF nie został obliczony podano ostatni aktualny).
- <sup>2</sup> Punkty MNiSW - Załącznik do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 stycznia 2017 r.
- <sup>3</sup> Liczba cytowań oraz Indeks Hirscha według Web of Science na dzień 3 października 2017 roku.

