

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Instytut Nauk o Żywności

### Załącznik 3

do wniosku o przeprowadzenie postępowania  
w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych  
w dyscyplinie technologia żywności i żywienia

## Autoreferat

Wpływ kultur bakterii mlekowych na proteolizę  
i występowanie substancji bioaktywnych w serach

dr inż. Monika Garbowska

Warszawa, 2022

## Spis treści

1. Dane osobowe .....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej .....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	3
4. Informacje o osiągnięciach naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny .....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....	4
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego .....	4
4.3. Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego .....	6
4.3.1. Wstęp .....	6
4.3.2. Cel i zakres badań .....	9
4.3.3. Aktywność proteolityczna i zdolność tworzenia bioaktywnych peptydów o właściwościach przeciwnadciśnieniowych przez wybrane szczepy bakterii mlekowych w modelach serów .....	10
4.3.4. Zdolność tworzenia bioaktywnych peptydów (L-karnozyny i anseryny), wolnych aminokwasów oraz amin biogennych przez wybrane szczepy bakterii mlekowych w modelach serów .....	18
4.3.5. Podsumowanie najważniejszych wyników będących przedmiotem osiągnięcia naukowego.....	24
5. Informacje o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej .....	32
5.1. Występowanie i charakterystyka bakterii z rodzaju <i>Cronobacter</i> w żywności .....	32
5.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa substancji pochodzenia roślinnego oraz antybiotyków wobec <i>Cronobacteri</i> bakterii kwasu mlekowego odpowiednio .....	36
5.3. Występowanie w żywności i charakterystyka wybranych cech fizjologicznych oraz toksyczności <i>Bacillus cereus</i> .....	39
5.4. Wybrane aspekty technologiczne i jakościowe produkcji serów typu holenderskiego .....	41
5.5. Wybrane aspekty bezpieczeństwa mikrobiologicznego i właściwości prozdrowotnych żywności .....	44
5.6. Podsumowanie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....	45
6. Inne osiągnięcia związane z aktywnością dydaktyczną i organizacyjną .....	47
6.1. Działalność dydaktyczna .....	47
6.2. Działalność organizacyjna .....	48
6.3. Działalność w towarzystwach naukowych i zespołach eksperckich .....	49
6.4. Otrzymane nagrody i wyróżnienia .....	49
6.5. Współpraca z ośrodkami naukowymi polskimi i zagranicznymi, recenzje publikacji .....	50
6.6. Współpraca z przemysłem .....	50
6.7. Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki.....	51

## 1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Monika Garbowska z d. Dolińska

Miejsce pracy: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Instytut Nauk o Żywności  
Katedra Technologii i Oceny Żywności  
Zakład Technologii Mleka  
ul. Nowoursynowska 159C  
02-776 WARSZAWA

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

2011 r. Stopień naukowy: doktor nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia  
Tytuł rozprawy doktorskiej: Wpływ warunków obróbki termicznej na aktywność proteolityczną wybranych kultur bakterii mlekowych  
Promotor: dr hab. Antoni Pluta, prof. SGGW  
Wydział Nauk o Żywności  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

2010 r. Podyplomowe Studia Doskonalenia Pedagogicznego  
Wydział Nauk Humanistycznych  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

2007 r. Tytuł zawodowy: magister inżynier w zakresie biotechnologii w przemyśle spożywczym  
Tytuł pracy magisterskiej: Studia nad wybranymi cechami fizjologicznymi i biochemicznymi szczepów *Bacillus cereus* pochodzących z różnych środowisk  
Promotor: dr hab. inż. Anna Berthold-Pluta  
Międzywydziałowe Studium Biotechnologii  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

06.2019 r. – obecnie adiunkt badawczo-dydaktyczny  
Zakład Technologii Mleka  
Katedra Technologii i Oceny Żywności  
Instytut Nauk o Żywności  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

04.2012 r. – 02.2019 r. adiunkt  
Międzyzakładowa Grupa Problemowa ds. Mleczarstwa  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie

Przerwy w pracy:

- 23.09.2013 r. - 23.03.2014 r. - z tytułu urodzenia pierwszego dziecka
- 14.01.2017 r. - 28.08.2017 r. - z tytułu urodzenia drugiego dziecka
- 19.01.2018 r. – 30.04.2018 r. – urlop wychowawczy

## 4. Informacje o osiągnięciach naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny

### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem naukowym wynikającym art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) jest cykl publikacji naukowych pt.:

*Wpływ kultur bakterii mlekowych na proteolizę i występowanie substancji bioaktywnych w serach*

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego:

H1. Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A. (2019): Antihypertensive peptide activity in Dutch-type cheese models prepared with different additional strains of *Lactobacillus* genus bacteria. Applied Sciences-Basel, 9(8), 1-10; MEiN<sub>2019</sub> = 100 pkt, IF<sub>2019</sub> = 2,474

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, koncepcja pracy, zaplanowanie doświadczeń, przeprowadzenie części badań, opracowanie wyników i sformułowanie wniosków, wiodąca rola w napisaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzjach (80%)*

H2. Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A. (2020): Proteolytic and ACE-inhibitory activities of Dutch-type cheese models prepared with different strains of *Lactococcus lactis*. Food Bioscience, 35, 1-7; MEiN<sub>2020</sub> = 70 pkt, IF<sub>2020</sub> = 4,240

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, koncepcja pracy, zaplanowanie doświadczeń, przeprowadzenie części badań, opracowanie wyników i sformułowanie wniosków, wiodąca rola w napisaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzjach (80%).*

H3. Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Różańska L., Pluta A. (2021): The impact of the adjunct heat-treated starter culture and *Lb. helveticus* LH-B01 on the proteolysis and ACE inhibitory activity in Dutch-type cheese model during ripening. Animals, 11, 2699; MEiN<sub>2021</sub> = 100 pkt, IF<sub>2021</sub> = 2,752

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, koncepcja pracy, zaplanowanie doświadczeń, przeprowadzenie badań, opracowanie wyników i sformułowanie wniosków, wiodąca rola w napisaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzjach (75%).*

H4. Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A. (2020): Contents of functionally bioactive peptides, free amino acids, and biogenic amines in Dutch-type cheese models produced with different lactobacilli. *Molecules*, 25, 5465; MEiN<sub>2020</sub> = 140 pkt, IF<sub>2020</sub> = 4,412

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, koncepcja pracy, zaplanowanie doświadczeń, przeprowadzenie części badań, opracowanie wyników i sformułowanie wniosków, wiodąca rola w napisaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzjach (80%).*

H5. Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A. (2020): Impact of nisin-producing strains of *Lactococcus lactis* on the contents of bioactive dipeptides, free amino acids, and biogenic amines in Dutch-type cheese models. *Materials*, 13 (8), 1-17; MEiN<sub>2020</sub> = 140 pkt, IF<sub>2020</sub> = 3,623

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, koncepcja pracy, zaplanowanie doświadczeń, przeprowadzenie części badań, opracowanie wyników i sformułowanie wniosków, wiodąca rola w napisaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzjach (80%).*

Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego wynosi 17,501  
Sumaryczna liczba punktów według punktacji MEiN prac stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego wynosi 550

### 4.3. Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego

#### 4.3.1. Wstęp

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) od lat są wykorzystywane w produkcji wielu mlecznych produktów fermentowanych, takich jak sery czy mleka fermentowane. Do głównych funkcji tych bakterii zaliczamy (I) fermentację z wykorzystaniem cukru mleka - laktozy, (II) redukcję potencjału redox, (III) fermentację cytrynianów oraz (IV) rozkład białek mleka (głównie kazeiny). Rozkład kazeiny przez bakterie kwasu mlekowego odgrywa zasadniczą rolę w tworzeniu charakterystycznego zapachu, smaku i tekstury produktów mlecznych. Optymalny wzrost LAB w mleku oprócz fermentacji laktozy opiera się na złożonym systemie proteolitycznym tych bakterii, który składa się z trzech podstawowych elementów: proteinaz związanych ze ścianą komórkową (PrtP), zlokalizowanych w membranie, systemów transportu peptydów (DtpT, Opp, Dpp) oraz różnorodnych wewnątrzkomórkowych peptydaz. Proteinazy związane ze ścianą komórkową rozpoczynają rozkład kazeiny przez bakterie mlekowe w wyniku czego tworzone są peptydy zawierające od 4 do 30 aminokwasów. Produkty rozkładu kazeiny przez zewnątrzkomórkowe proteinazy są następnie przenoszone do wnętrza komórki przez specyficzne transportery. Transporter DtpT odpowiedzialny jest za przenoszenie hydrofilowych di- i tripeptydów. Systemy transportowe Opp i Dpp (DppA, DppP) zaliczane są do rodziny transporterów ABC. Opp odpowiada za transport peptydów zawierających od 4 do 35 aminokwasów, DppA za transport di- i tripeptydów, natomiast DppP za transport peptydów zawierających co najmniej 9 aminokwasów. Peptydy przetransportowane do wnętrza komórki ulegają dalszym przemianom do prostszych związków w wyniku działania wewnątrzkomórkowych peptydaz [Fox i wsp. 2017, Liu i wsp. 2010, Savijoki i wsp. 2006].

Proteoliza jest jednym z najważniejszych procesów biochemicznych odgrywających zasadniczą rolę w wytwarzaniu typowych cech i przechowywaniu wielu mlecznych produktów fermentowanych. W produkcji sera rozkład kazeiny do polipeptydów, peptydów i aminokwasów jest szczególnie istotny, ponieważ powstałe w wyniku proteolizy związki takie jak: aminokwasy, alkohole, aldehydy, kwasy, estry oraz związki siarkowe są prekursorami specyficznych cech smakowo-zapachowych [Ardö i wsp. 2017, Fox i wsp. 2017, Smit i wsp. 2005]. Jedną z wad serów typu Gouda i Cheddar jest goryczka, która jest rezultatem nagromadzenia hydrofobowych peptydów (zwłaszcza bogatych w prolinę tzw. gorzkich peptydów) [Smukowski i wsp. 2003]. Specyficzność zewnątrzkomórkowych proteinaz (CEPs-cell envelope proteinases) odgrywa zasadniczą rolę w powstawaniu tych związków [Broadbent i wsp. 2002]. Peptydazy kultur LAB takie jak PepN, PepX, PepO2, PepO3 biorą udział w degradacji gorzkich peptydów i są tym samym odpowiedzialne za korzystne cechy sensoryczne produktów mlecznych [Chen i wsp. 2003, Christensen i Steele 2003, Meyer i Spahni 1998, O'Sullivan i wsp. 2009, Sridhar i wsp. 2005]. Jednak najistotniejsze jest aby procesy proteolityczne przebiegały w sposób zrównoważony, co jest szczególnie ważne w tworzeniu odpowiedniego zapachu i zapobieganiu wady goryczki w serach [Smit i wsp. 2005].

Fermentowane produkty mleczne często określane są jako produkty funkcjonalne, pomimo, że w sensie prawnym nie występują pod tą nazwą jako osobna kategoria żywności. Produkty funkcjonalne to takie, które poza dostarczeniem składników odżywczych wpływają na poprawę stanu zdrowia bądź zmniejszają ryzyko wystąpienia niektórych chorób m.in. układu krążenia, nowotworowych czy osteoporozy, jak również wykazują określone właściwości dietetyczne dla osób z zaburzeniami metabolizmu [Ryhänen i wsp. 2001].

Fragmety białek pozostające nieaktywne w sekwencjach białek prekursorowych, uwolnione w wyniku hydrolizy enzymatycznej, mogące oddziaływać z odpowiednimi receptorami organizmu, tym samym regulujące jego funkcje fizjologiczne noszą nazwę biologicznie i funkcjonalnie aktywnych peptydów lub bioaktywnych peptydów. Bioaktywne peptydy o różnych aktywnościach tworzone są w wyniku proteolizy białek mleka będących źródłem związków azotowych dla bakterii mlekowych [Dziuba i Dziuba 2014, Lucarini 2017]. Wielu autorów badało obecność i właściwości funkcjonalne różnych bioaktywnych peptydów powstających podczas dojrzewania serów [Fontenele i wsp. 2017, Pisanu i wsp. 2015, Sadat-Mekmene i wsp. 2013].

Grupa peptydów o właściwościach przeciwnadciśnieniowych jest najlepiej dotąd poznana i scharakteryzowaną grupą wśród bioaktywnych peptydów pochodzących z żywności. Większość peptydów tej grupy jest inhibitorami enzymu przekształcającego angiotensynę I, hydrolazy peptydyldipeptydowej (EC.3.4.15.1), zwanego również enzymem konwertującym angiotensynę (ACE). ACE hydrolizuje prohormon – angiotensynę I do angiotensyny II, która oddziałując z dwoma receptorami, powoduje skurcz naczyń krwionośnych, a w konsekwencji zwiększa ciśnienie krwi. Prekursorem angiotensyny I jest angiotensynogen (globulina  $\alpha_2$ ), który syntetyzowany jest w wątrobie i składa się z 452 aminokwasów. W układzie reninowo-angiotensynowym biorącym udział w regulacji ciśnienia tętniczego, angiotensynogen jest hydrolizowany przez reninę (proteinaza aspartylowa, EC 3.4.23.15), która odczepia N-końcowy decapeptyd (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), określany mianem angiotensyny I. Następnie w wyniku działalności ACE odłączany jest C-końcowy dipeptyd, co prowadzi do powstania angiotensyny II [Dziuba i Dziuba 2014, Fernández i wsp. 2015]. Wzrost zawartości angiotensyny II powoduje ostatecznie wzrost ciśnienia tętniczego. Dlatego produkty spożywcze, które mogą blokować reakcję przekształcania angiotensyny I do angiotensyny II mogą być naturalnym odpowiednikiem leków obniżających ciśnienie tętnicze. Sery podpuszczkowe dojrzewające oprócz wielu innych zalet w większym lub mniejszym stopniu są takimi właśnie produktami.

Większość peptydów pochodzących z białek mleka ma wiele właściwości. Przykładem jest fragment f60-70  $\beta$ -kazeiny, który wykazuje funkcje immunostymulujące, opioidowe oraz hamujące aktywność ACE. Sekwencja ta została określona mianem obszaru strategicznego i jest oporna na proteolizę z powodu swojej silnej hydrofobowości oraz obecności reszt proliny. Innym multifunkcyjnym peptydem jest fragment f194-199  $\alpha$ -S1-kazeiny wykazujący działanie immunomodulujące i inhibitujące ACE [Korhonen i Pihlanto 2006, Sharma i wsp. 2011].

W literaturze opisanych jest 420 peptydów z aktywnością inhibitującą ACE (określaną jako  $IC_{50} < 1000$  mM) pochodzących z ośmiu gatunków serów i dziewięciu białek mleka, z czego 327 to unikalne sekwencje peptydowe. Różne frakcje kazeiny są pierwotnymi białkami dla 77% wszystkich opisanych peptydów hamujących ACE. Wynika to z tego, że w znacznym stopniu badania z tego zakresu prowadzone są na serach, które głównie zawierają kazeinę. Sery stanowią ważne źródło bioaktywnych peptydów wytwarzanych przez szeroki zakres proteaz LAB i innej mikroflory aktywnej podczas ich dojrzewania [Nielsen i wsp. 2017].

Obecność aktywnych peptydów w serach, które są naturalnie tworzone, zależy od złożonej równowagi między ich powstawaniem a postępującą degradacją przez system proteolityczny w czasie dojrzewania sera [Lu i wsp. 2016, Sieber i wsp. 2010]. Stwierdzono, że w czasie dojrzewania serów intensywne procesy proteolityczne powodują wzrost aktywności inhibitorów ACE, lecz tylko do pewnego poziomu, po czym wartość inhibicji ACE zmniejsza się. Wyniki te mogą sugerować, że bioaktywne peptydy uwalniane w wyniku działalności enzymów proteolitycznych LAB w trakcie

dojrzewania sera są degradowane dalej do nieaktywnych fragmentów jako efekt dalszej proteolizy [Addeo i wsp. 1992, Smacchi i Gobbetti 2000].

Obecnie na rynku istnieją produkty mleczne (Calpis™ and Evolus®), o udokumentowanym klinicznym działaniu obniżającym ciśnienie tętnicze krwi, jednak nie ma wśród nich serów dojrzewających. Prowadzone były badania *in vivo* mające na celu potwierdzenie funkcjonalności produktów zawierających bioaktywne peptydy u pacjentów [Dziuba i Dziuba 2014, EFSA 2008, Korhonen i Pihlanto 2006].

Substancje bioaktywne cieszą się aktualnie dużym zainteresowaniem przemysłu spożywczego i farmaceutycznego. Badania potwierdzają występowanie aminokwasów nie-proteinogennych o bioaktywnych funkcjach w serach takich jak kwas gamma-aminomasłowy (GABA) i ornityna (Orn) [Diana i wsp. 2014]. Kurata i wsp. [2011] wykazali działanie uspokajające i nasenne L-ornityny u szczurów narażonych na silny stres. Ornityna tłumi również zmęczenie, zwiększając efektywność zużycia energii i ułatwia wydalanie amoniaku [Sugino i wsp. 2008]. Do bioaktywnych substancji należą również L-karnozyna ( $\beta$ -alanylo-histydyna), dipeptyd złożony z  $\alpha$ -alaniny i L-histydyny i jej metylowany analog - anseryna (1-metyl-karnozyna). Występują one w mięśniach szkieletowych i tkankach nerwowych różnych kręgowców, takich jak ryby, ptaki i ssaki. Ich zawartość w organizmie człowieka zależy od płci (wyższy poziom u mężczyzn), wieku (stężenie obniża się wraz z wiekiem) i diety (u wegetarian poziom L-karnozyny i anseryny jest niższy) [Boldyrev i wsp. 2013]. Synteza L-karnozyny w mięśniach szkieletowych zależy od dostępności w organizmie aminokwasów: alaniny i histydyny. L-karnozyna wykazuje szereg korzystnych cech, w tym ma działanie antyglukacyjne i przeciwutleniające [Boldyrev i wsp. 2013, Mori i wsp. 2015]. Ponieważ te właściwości są związane ze starzeniem się, zakłada się, że L-karnozyna jest endogennym środkiem neuroprotektynym przeciwdziałającym starzeniu się. Wyniki badań sugerują, że suplementacja diety karnozyną może być skuteczna w zapobieganiu lub leczeniu chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimer. Poza tym L-karnozyna wykazuje właściwości chelatujące jony metali (żelaza, miedzi, cynku i kobaltu). Wiążąc jony cynku i miedzi zmniejsza ich toksyczność [Boldyrev i wsp. 2013, Corona i wsp. 2011]. Stwierdzono, że suplementacja diety L-karnozyną i anseryną jest skuteczna dla wzmocnienia funkcji poznawczych u osób starszych [Szcześniak i wsp. 2014]. Mechanizm działania karnozyny nie jest do końca poznany, ale przypuszczalnie poprawia ona funkcjonowanie układu nerwowego w płatach skroniowych i czołowych kory mózgu [Chez i wsp. 2002]. Niektóre badania wskazują, że L-karnozyna jest naturalnym inhibitorem enzymu konwertazy angiotensyny a tym samym może uczestniczyć w regulacji ciśnienia tętniczego, wykazuje właściwości antyproliferacyjne oraz może wpływać na pracę układu sercowo-naczyniowego [Boldyrev i wsp. 2013, Iovine i wsp. 2012, Roberts i Zaloga 2000]. Tomonaga i wsp. [2007] określili, że doustne podawanie ekstraktu z kurczaka podnosi poziom L-karnozyny w mózgu. Wyniki powyższych badań wskazują, że analiza ilości L-karnozyny i anseryny w żywności jest niezbędna do opracowania odpowiedniej terapii suplementacyjnej. Przedstawiane w literaturze wyniki badań dotyczące występowania L-karnozyny w produktach spożywczych dotyczą głównie produktów mięsnych i ryb [Corona i wsp. 2011, Mori i wsp. 2015]. Nie znaleziono w dostępnym piśmiennictwie danych o występowaniu tych dipeptydów w serach podpuszczkowych dojrzewających.

Wynikiem daleko posuniętej proteolizy w serach są aminokwasy, w tym także aminokwasy będące prekursorami amin biogennych (AB). Aminy biogenne są związkami azotowymi o małej masie cząsteczkowej, które powstają w artykułach spożywczych w wyniku mikrobiologicznej dekarboksylacji aminokwasów prekursorowych. AB mogą być szkodliwymi związkami o funkcjach neuroaktywnych i dlatego ich obecność w produktach spożywczych powinna być monitorowana. Obecność AB w żywności może wpływać na występowanie szeregu problemów dla osób wrażliwych, u których mogą pojawiać się takie objawy jak: bóle głowy, zawroty głowy, nudności, wymioty oraz zwiększone ciśnienie tętnicze krwi [Ladero i wsp. 2010, Lázaro



de la Torre i Conte-Junior 2018]. Według EFSA [2011] sery należą do produktów fermentowanych najczęściej związanych z obecnością AB. Obecnie w Unii Europejskiej nie istnieje prawodawstwo określające górny poziom zawartości AB w serach. W literaturze dobrze udokumentowano występowanie AB w różnych odmianach serów wytwarzanych z mleka krowiego, owczego, koziego. Większość mlecznych produktów fermentowanych w tym sery zawiera śladowe ilości histaminy, tyraminy, putrescyny, kadaweryny i 2-fenyloetyloaminy [Buňková i wsp. 2013, Flasarová i wsp. 2016, Linares i wsp. 2011, 2012, Mayer i Fiechter 2018, Piras i wsp. 2013, Poveda i wsp. 2015, Renes i wsp. 2019, Spizzirri i wsp. 2013]. Występowanie AB w serach związane jest głównie z zanieczyszczeniem mikrobiologicznym będącym wynikiem złych praktyk produkcyjnych lub niewystarczających warunków higienicznych. W serach z mleka pasteryzowanego obecność AB jest związana z aktywnością niestarterowych bakterii kwasu mlekowego (NSLAB) [Buňková i wsp. 2010].

Pod względem podatności do dekarboksylacji powodującej powstawanie AB, najbardziej istotnymi wolnymi aminokwasami są arginina, ornityna i tyrozyna. Putrescyna może być tworzona przez bakterie Gram(+) w dwóch różnych szlakach metabolicznych. Arginina może być przekształcana w ornitynę, która z kolei może być dekarboksylowana do putrescyny lub do agmatyny za pomocą dekarboksylazy argininowej. Następnie agmatyna przekształcana jest w putrescynę [Wunderlichová i wsp. 2014]. Tyrozyna jest prekursorem tyraminy [Fiechter i wsp. 2013].

Bakterie mlekowe wykazują różną aktywność proteolityczną oraz zdolność do wytwarzania zarówno amin biogennych jak i substancji bioaktywnych w rzeczywistym środowisku produktów spożywczych w tym również w serach. Dlatego też podjęłam badania mające na celu określenie aktywności proteolitycznej i zdolności wytwarzania bioaktywnych peptydów jak również amin biogennych w modelach serów w czasie dojrzewania.

#### 4.3.2. Cel i zakres badań

Nadrzędnym celem badań i analizy piśmiennictwa, opisanych w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgodnie 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. Dz. U. z 2011 r. nr 204, poz. 1200), było określenie aktywności proteolitycznej, aktywności inhibitorów ACE, możliwości tworzenia bioaktywnych peptydów, wolnych aminokwasów oraz amin biogennych przez wybrane szczepy bakterii mlekowych (z rodzaju *Lactococcus* jak i *Lactobacillus*) w modelach serów otrzymanych z ich dodatkiem.

Zakres badawczy cyklu publikacji, stanowiących podstawę postępowania o nadanie tytułu doktora habilitowanego, obejmował dwa etapy:

##### Etap 1.

Dotyczył badań mających na celu określenie aktywności proteolitycznej oraz możliwości tworzenia bioaktywnych peptydów o właściwościach przeciwnadciśnieniowych przez wybrane szczepy bakterii mlekowych w modelach serów otrzymanych z ich udziałem. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach etapu 1 opublikowałam w następujących trzech manuskryptach:

H1. Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A. (2019): Antihypertensive peptide activity in Dutch-type cheese models prepared with different additional strains of *Lactobacillus* genus bacteria. *Applied Sciences-Basel*, 9(8), 1-10;

H2. Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A. (2020): Proteolytic and ACE-inhibitory activities of Dutch-type cheese models prepared with different strains of *Lactococcus lactis*. *Food Bioscience*, 35, 1-7;

H3. Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Róžańska L., Pluta A. (2021): The impact of the adjunct heat-treated starter culture and *Lb. helveticus* LH-B01 on the proteolysis and ACE inhibitory activity in Dutch-type cheese model during ripening. *Animals*, 11, 2699.

#### Etap 2.

Obejmował określenie zmian zawartości bioaktywnych peptydów (L-karnozyny i anseryny), wolnych aminokwasów oraz amin biogennych w modelach serów otrzymanych z dodatkiem wybranych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Lactococcus* w czasie dojrzewania. Wyniki otrzymane w etapie 2 omówiłam w publikacjach:

H4. Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A. (2020): Contents of functionally bioactive peptides, free amino acids, and biogenic amines in Dutch-type cheese models produced with different lactobacilli. *Molecules*, 25, 5465;

H5. Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A. (2020): Impact of nisin-producing strains of *Lactococcus lactis* on the contents of bioactive dipeptides, free amino acids, and biogenic amines in Dutch-type cheese models. *Materials*, 13 (8), 1-17,

wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszego postępowania habilitacyjnego.

#### 4.3.3. Aktywność proteolityczna i zdolność tworzenia bioaktywnych peptydów o właściwościach przeciwnadciśnieniowych przez wybrane szczepy bakterii mlekowych w modelach serów

Szczepy z gatunków stosowanych w przemyśle mleczarskim (np. *Lb. helveticus*, *Lb. delbrüeckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lactococcus lactis* lub *S. thermophilus*) zdolne są do wytwarzania bioaktywnych peptydów [Hafeez i wsp. 2014, Hajirostamloo 2010]. Z powyższych względów oraz z uwagi na brak danych z tego zakresu w piśmiennictwie krajowym, podjęłam się badań, których celem było określenie możliwości tworzenia bioaktywnych peptydów o właściwościach przeciwnadciśnieniowych przez wybrane szczepy bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* w modelach serów otrzymanych z ich udziałem (publikacja H1).

Na potrzeby badań opracowano metodę otrzymywania modeli serów w warunkach laboratoryjnych, które wykorzystano jako materiał badawczy we wszystkich etapach. Otrzymane modele serów różniły się jedynie zastosowanym dodatkowym szczepem bakterii mlekowych. Materiałem badawczym w publikacji H1 były 4 modele serów otrzymane z handlowym starterem podstawowym CHN-19 (*Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *L. mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*) oraz zawierające dodatkowo szczepy *Lb. casei* 2639, *Lb. acidophilus* 2499, *Lb. rhamnosus* 489 lub *Lb. delbrüeckii* 490. W otrzymanych modelach serów oznaczono aktywność proteolityczną i aktywność inhibitorów ACE w czasie dojrzewania. W badaniach określono również początkową i ogólną aktywność proteolityczną 4 szczepów pałeczek *Lactobacillus* zastosowanych jako dodatkowe szczepy bakterii poprzez ich hodowlę w regenerowanym mleku w proszku (RSM-reconstituted skim milk) w czasie 6 i 24 h inkubacji odpowiednio.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że początkowa aktywność proteolityczna wszystkich badanych szczepów LAB była zbliżona i nie różniła się statystycznie od aktywności uzyskanej w próbce kontrolnej. W początkowym okresie fermentacji była zachowana równowaga pomiędzy zużywaniem wolnych aminokwasów a rozkładem peptydów i białek mleka przez LAB. Natomiast w ogólnej aktywności proteolitycznej mierzonej po 24 h stwierdzono zróżnicowanie. Spośród badanych szczepów *Lb. delbrüeckii* 490 wykazywał najniższą a *Lb. casei* 2639 najwyższą aktywność proteolityczną (około dwukrotnie większą niż *Lb. delbrüeckii* 490). Zbyt duża aktywność proteolityczna szczepów

wykorzystywanych jako dodatkowe, ale aktywne kultury w produkcji serów, nie jest pożądana, ponieważ może to prowadzić do zbyt szybkich przemian proteolitycznych w trakcie dojrzewania, wpływając tym samym na zmianę cech sensorycznych serów (gorzki smak, nietypowy zapach). Donkor i wsp. [2007] określili początkową aktywność proteolityczną oraz ogólną aktywność proteolityczną (po 24-godzinnej inkubacji) probiotycznych szczepów *Lb. acidophilus* LAFTI L10 i *Lb. casei* LAFTI L26 oraz *Lb. acidophilus* 4962 i *Lb. casei* 279. Autorzy ci podobnie jak w niniejszej pracy nie stwierdzili różnic w początkowej aktywności proteolitycznej pomiędzy badanymi szczepami.

Badane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* charakteryzowały się różną ogólną aktywnością proteolityczną. Duże różnice w aktywności proteolitycznej bakterii mlekowych mogą wynikać ze zróżnicowanej aktywności ich systemu proteolitycznego, a tym samym z różnej ilości uwalnianych grup aminowych w trakcie inkubacji oraz ich różnego zapotrzebowania odżywczego.

Aktywność proteolityczną oraz aktywność peptydowych inhibitorów ACE w badanych modelach serów wyznaczano w czasie 5 tygodni dojrzewania. Od pierwszego tygodnia dojrzewania aktywność hamująca ACE w modelach serów kontrolnych była niższa niż w pozostałych badanych modelach serów. W modelach serów z dodatkowymi szczepami pałeczek LAB stwierdzono inhibicję ACE na zbliżonym poziomie, ale wyraźnie wyższą od modeli serów kontrolnych. Największą zdolność inhibicji ACE zaobserwowano w modelach serów z dodatkiem *Lb. delbrüeckii* 490 i była ona równa 96%. Dodatkowe szczepy bakterii mlekowych miały również wpływ na aktywność proteolityczną w badanych modelach serów. Po 5 tygodniach dojrzewania najniższą aktywność proteolityczną określono w modelach serów z dodatkiem *Lb. delbrüeckii* 490 oraz w kontrolnych, a najwyższą - wykazywały modele serów z dodatkiem *Lb. rhamnosus* 489 (1,5 razy wyższą od aktywności proteolitycznej w modelach serów kontrolnych).

Otrzymane wyniki badań wskazują, że w dużym stopniu za przemiany proteolityczne zachodzące w trakcie dojrzewania modeli serów odpowiadały kultury dodatkowe, które intensyfikowały hydrolizę kazeiny uwalniając z jej łańcuchów peptydy odpowiedzialne za inhibicję ACE. Biorąc pod uwagę aktywność proteolityczną badanych szczepów LAB w modelach serów wyznaczoną poprzez określanie wolnych grup aminowych, będących miarą stopnia zachodzącej proteolizy w czasie dojrzewania, zaobserwowano zmienność ich aktywności w trakcie dojrzewania modeli serów. W zależności od zastosowanego dodatkowego szczepu LAB stwierdzono zróżnicowaną i zwiększającą się aktywność proteolityczną w modelach serów wraz z upływem czasu dojrzewania.

Wartość  $IC_{50}$  jest ściśle związana z peptydową aktywnością inhibicji ACE, ponieważ określa stężenie inhibitora hamujące w 50% aktywność enzymu. Najwyższą wartość  $IC_{50}$  po 5 tygodniach dojrzewania stwierdzono w kontrolnych modelach serów (0,8 mg/ml) natomiast spośród modeli serów z dodatkiem bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* najniższą wartość  $IC_{50}$  stwierdzono w modelach serów zawierających *Lb. delbrüeckii* 490 (0,4 mg/ml), a najwyższą dla wariantu zawierającego *Lb. casei* 2639 (0,5 mg/ml). Określono, że lepszym wskaźnikiem porównania efektywności inhibicji enzymu jest parametr  $IC_{50}$ , ponieważ uwzględnia on stężenie peptydów i rozpuszczonych białek w próbce.

Przedstawione w piśmiennictwie wyniki badań wskazują, że istnieją duże różnice w aktywności inhibicji ACE w różnych gatunkach serów. Określenie, w którym etapie dojrzewania sera zawartość bioaktywnych peptydów jest najwyższa może wpływać na określenie momentu w czasie dojrzewania, kiedy sery będą miały największe właściwości prozdrowotne [Pripp i wsp. 2006, Smacchi i Gobbetti 1998]. Meisel i wsp. [1997] stwierdzili, że wśród badanych krótko-, średnio- i długodojrzewających serów Gouda największą zdolnością inhibicji ACE charakteryzowały się sery średniodojrzewające. Z kolei Saito i wsp. [2000] nieco wyższą inhibicję ACE określili wśród serów Gouda dojrzewających 24 miesiące niż wśród tych dojrzewających 8 miesięcy. Należy jednak zauważyć, że sery typu holenderskiego powszechnie produkowane

i spożywane na całym świecie w przeważającej masie praktycznie nie poddaje się zbyt długiemu dojrzewaniu. Ich zalecany minimalny czas dojrzewania to 5 - 8 tygodni z częstą tendencją do skracania. Z tego względu badania serów tego typu o kilku do kilkudziesięciu razy dłuższym okresie dojrzewania dotyczą stosunkowo niedużej ilości rynkowych serów. W przedstawianych badaniach modele serów dojrzewały tylko przez 5 tygodni i w tym czasie zaobserwowano wzrost aktywności inhibitorów ACE. Potwierdza to zasadność minimalnego 5 tygodniowego dojrzewania serów typu holenderskiego. Przeciwnadciśnieniowe peptydy pochodzące z sześciomiesięcznego sera Parmezan nie były już wykrywane po 15 miesiącach dojrzewania [Addeo i wsp. 1992]. Występowanie bioaktywnych peptydów o właściwościach zmniejszających ciśnienie krwi jest również określane w serach o krótkim (Crescenza i Italic) i średnim czasie dojrzewania (Gorgonzola). Fragment  $\beta$ -kazeiny (58-72) zawierający sekwencję  $\beta$ -kazomorfiny-7, który wykazywał efekt przeciwnadciśnieniowy wyizolowano z sera typu Crescenza oraz Cheddar [Smacchi i Gobetti 2000]. Ryhänen i wsp. [2001] podają, że 6-tygodniowe sery Festivo charakteryzowały się najniższą aktywnością inhibicji ACE, a najwyższą – 13-tygodniowe. Ong i wsp. [2007] stwierdzili, że w czasie pierwszych 24 tygodni dojrzewania probiotycznych i kontrolnych serów Cheddar zawartość inhibitorów ACE rosła, a w trakcie kolejnych 12 tygodni utrzymywała się na zbliżonym poziomie. Ong i Shah [2008a] zaobserwowali wzrost aktywności inhibicji ACE w serach Cheddar zawierających dodatkowe szczepy bakterii probiotycznych głównie w trakcie pierwszych 6 tygodni dojrzewania. Wykazano, także że wzrost temperatury dojrzewania serów Cheddar (z 4 do 8-12 °C) pozytywnie wpływał na zawartość przeciwnadciśnieniowych peptydów w tych serach [Ong i Shah 2008b]. Natomiast Meyer i wsp. [2009] wykazali, że w początkowym okresie dojrzewania serów Emmental inhibicja ACE malała, po czym nastąpił jej wzrost, a sery Gruyère charakteryzowała największa zawartość inhibitorów ACE w momencie ich dojrzałości rynkowej. Meira i wsp. [2012] określili występowanie bioaktywnych peptydów w owczych serach handlowych dostępnych w południowej Brazylii i Urugwaju, których czas dojrzewania mieścił się w zakresie od 30 do 270 dni. Najmniejszą aktywnością hamującą ACE charakteryzowały się świeże sery typu Feta a największą sery typu Roquefort dojrzewające 90 dni (ACE około 80%,  $IC_{50}$  – 0,34 mg/ml). Sery produkowane z mleka niepasteryzowanego charakteryzowały się większą zdolnością inhibicji ACE od serów otrzymywanych z mleka poddawanego obróbce cieplnej, co prawdopodobnie wynika z obecności w nich NSLAB, które przyczyniają się do intensyfikacji przemian proteolitycznych zachodzących w trakcie dojrzewania serów, a co za tym idzie do tworzenia różnorodnych peptydów o różnych właściwościach.

Należy zwrócić uwagę, że trudno jest ustalić ścisły związek między aktywnością hamującą ACE *in vitro* i działaniem przeciwnadciśnieniowym *in vivo*. Wpływa to na powstałe wątpliwości dotyczące wykorzystania aktywności hamującej ACE *in vitro* jako wyłącznego kryterium określającego substancje o działaniu potencjalnie przeciwnadciśnieniowym z uwagi na możliwość ich przemian fizjologicznych *in vivo* [Stuknytė i wsp. 2015]. Potwierdzeniem tego są badania Bernabucci i wsp. [2014], którzy wykazali, że aktywność inhibitorów ACE *in vitro* naturalnie uformowanych bioaktywnych peptydów w serach Parmigiano Reggiano i Grana Padano nie wpływała na obniżenie ciśnienia *in vivo*.

Kolejnym, podjętym przeze mnie, kierunkiem badawczym, który wynikał z interpretacji wyników otrzymanych w publikacji H1 było określenie możliwości tworzenia bioaktywnych peptydów o właściwościach przeciwnadciśnieniowych przez wybrane szczepy bakterii mlekowych z rodzaju *Lactococcus* w modelach serów otrzymanych z ich udziałem (publikacja H2). W badaniach określono początkową i ogólną aktywność proteolityczną dodatkowych 3 szczepów *Lactococcus*, a także oznaczono aktywność proteolityczną i aktywność inhibitorów ACE w czasie 5 tygodni dojrzewania w otrzymanych modelach serów.

Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, że początkowa aktywność proteolityczna wszystkich badanych szczepów *Lc. lactis* była niewielka. Brak wyraźnych różnic w aktywności proteolitycznej może wynikać z tego, że w początkowym okresie fermentacji była zachowana równowaga pomiędzy zużywaniem wolnych aminokwasów a rozkładem peptydów i białek mleka przez LAB. Natomiast w przypadku ogólnej aktywności proteolitycznej badanych szczepów *Lc. lactis* wykazano istotne statystycznie różnice między szczepami. Najniższą ogólną aktywność proteolityczną wykazywał *Lc. lactis* 11454 (0,35), natomiast najwyższą - *Lc. lactis* 2379 (0,46). Picon i wsp. [2010a] wyznaczyli ogólną aktywność proteolityczną 24 szczepów należących do gatunku *Lc. lactis* i także stwierdzili różnice między szczepami.

Różnice zarówno pod względem aktywności inhibicji ACE, jak i aktywności proteolitycznej stwierdzono już w jednodniowych modelach serów. W modelach serów otrzymanych z dodatkiem *Lc. lactis* 2379 inhibicja ACE wynosiła ok. 40% i była najniższa spośród wszystkich badanych modeli serów. Z kolei najwyższą aktywnością hamującą ACE charakteryzowały się modele serów z dodatkiem *Lc. lactis* 476, a także *Lc. lactis* 11454 (ok. 53%). Stwierdzono różnice w aktywności proteolitycznej tych bakterii, która w modelach serów z dodatkiem *Lc. lactis* 476 wynosiła 0,19 a z *Lc. lactis* 11454 - 0,23. Zupełnie odmiennie przedstawiała się ogólna aktywność proteolityczna tych szczepów bakterii mlekowych, a mianowicie najniższą aktywnością charakteryzował się *Lc. lactis* 11454, a nieznacznie wyższą *Lc. lactis* 476. Ogólna aktywność proteolityczna badanych szczepów była odmienna od aktywności proteolitycznej w modelach serów otrzymanych z ich dodatkiem. Wynikać to może z odmienności środowiska wzrostu (RSM versus model sera), ale przede wszystkim z obecności innych szczepów bakterii wchodzących w skład podstawowej kultury starterowej (CHN-19) w modelach serów.

Inhibicję ACE powyżej 90% po 5 tygodniach dojrzewania stwierdzono we wszystkich modelach serów z *Lc. lactis* 476, *Lc. lactis* 2379 oraz *Lc. lactis* 11454. Dodatkowe szczepy *Lactococcus* wpływały na uzyskanie wyższej inhibicji ACE od tej uzyskanej w modelach serów kontrolnych pod koniec dojrzewania. Po 5 tygodniach dojrzewania stwierdzono wyraźne różnice w aktywności proteolitycznej badanych modeli serów. Najniższą aktywnością proteolityczną cechowały się modele serów z dodatkiem *Lc. lactis* 476 oraz kontrolne (średnio ok. 0,40), a najwyższą - modele serów z dodatkiem *Lc. lactis* 11454 (1,5 razy wyższą od aktywności proteolitycznej w modelach serów kontrolnych). Wyniki te wskazują, że za przemiany proteolityczne zachodzące w trakcie dojrzewania modeli serów odpowiada zarówno podstawowa kultura starterowa, jak również dodatkowe szczepy bakterii mlekowych, które intensyfikują hydrolizę kazeiny uwalniając z jej łańcuchów peptydy odpowiedzialne za inhibicję ACE. Co prawda w przypadku serów z dodatkowymi kulturami od razu na początku wniesiono większą sumaryczną biomasę bakterii starterowych (około 25%) w porównaniu do modeli serów kontrolnych, co może być przyczyną wyraźnie wyższej aktywności proteolitycznej. Jednak w modelach serów z dodatkiem *Lc. lactis* 476 aktywność proteolityczna po 1, 3 i 5 tygodniach dojrzewania była taka sama lub bardzo podobna do aktywności modeli serów kontrolnych. Świadczy to o tym, że na aktywność proteolityczną w trakcie dojrzewania modeli serów bardziej od ilości dodawanego startera, miał wpływ zastosowany dodatkowy szczep LAB (czego potwierdzeniem są wyniki uzyskane w przypadku zastosowania dodatkowych szczepów *Lc. lactis* 2379 i *Lc. lactis* 1145). Potwierdza to możliwość stosowania bardziej złożonych starterów w produkcji serów w celu przyspieszania proteolizy serów, ale również intensyfikacji tworzenia peptydów inhibitujących angiotensynę, co tym samym może stanowić przyczynek do opracowania technologii produkcji serów o potencjalnej aktywności hipotensyjnej.

Największy przyrost zawartości produktów proteolizy w czasie dojrzewania stwierdzono w modelach serów z dodatkiem *Lc. lactis* 11454 oraz *Lc. lactis* 2379. Zwiększenie aktywności proteolitycznej w czasie dojrzewania serów Hispánico otrzymali Picon i wsp. [2010b].

Na podstawie analizy aktywności proteolitycznej LAB trudno jest przewidzieć ich wpływ na peptydową aktywność inhibicji ACE. Może to wynikać z tego, że sery stanowią bardzo złożone środowisko dla rozwoju bakterii mlekowych, a wzrost drobnoustrojów zależny jest od wielu czynników występujących zarówno w czasie otrzymywania serów, jak i samego procesu dojrzewania. Poza tym, enzymy wchodzące w skład złożonego systemu proteolitycznego badanych szczepów LAB mogły wykazywać różną aktywność, jak również wpływ na to mogły mieć interakcje zachodzące pomiędzy szczepami wchodzącymi w skład startera podstawowego a dodatkowymi szczepami LAB.

Sery dojrzewające są produktami szeroko badanymi pod kątem występowania inhibitorów ACE. Zdolności hamujące przez inhibitory ACE występujące w serach zależne są od różnych czynników, do których należą: rodzaj, typ, gatunek i odmiana sera, technologia jego wyrobu (w tym zastosowanie obróbki cieplnej mleka), zastosowane w produkcji podstawowe i dodatkowe kultury starterowe oraz temperatura i czas dojrzewania serów [Stuknytė i wsp. 2015]. Hernández-Galán i wsp. [2016] wykazali, że w czasie dojrzewania serów Cotija (ser twardy meksykański otrzymywany z surowego mleka krowiego) peptydy o aktywności inhibicji ACE były uwalniane przez cały okres dojrzewania osiągając 100% inhibicji ACE pod koniec dojrzewania. Występowanie inhibitorów ACE w większym stopniu może więc zależeć od samych czynników produkcji i warunków dojrzewania serów niż od gatunku sera.

W modelach serów z dodatkowymi paciorkowcami mlekowymi określono również wartość parametru  $IC_{50}$  w czasie dojrzewania. Zarówno bezpośrednio po wyrobie jak i po tygodniu dojrzewania najniższą wartość  $IC_{50}$  stwierdzono wśród modeli serów z dodatkiem *Lc. lactis* 11454, nieco wyższą dla modeli serów z dodatkiem *Lc. lactis* 2379, a największą dla modeli z *Lc. lactis* 476 oraz kontrolnych. Po 5 tygodniach dojrzewania z najwyższą efektywnością inhibicja ACE zachodziła w modelach serów zawierających *Lc. lactis* 11454 (0,32 mg/ml), czego potwierdzeniem była otrzymana aktywność inhibicji ACE po 5 tygodniach dojrzewania oraz aktywność proteolityczna tego modelu sera. We wszystkich modelach serów zawierających dodatkowe szczepy *Lactococcus* uzyskano bardzo zbliżone wartości  $IC_{50}$  i jednocześnie istotnie niższe w modelach serów kontrolnych.

Zastosowanie *Lb. helveticus* uważane jest za najbardziej korzystne ze względu na proteolizę w serach, jak również tworzenie z kazeiny bioaktywnych peptydów szczególnie o aktywności przeciwnadciśnieniowej i antymikrobiologicznej, redukowaniu ryzyka wystąpienia raka jelita grubego a nawet uważany jest za immunomodulator w mleku fermentowanym i serach [Beganović i wsp. 2013]. Bakterie *Lb. helveticus* wykazują dużą bioróżnorodność w zakresie genów proteaz oraz charakteryzują się występowaniem od 1 do 4 proteinaz związanych ze ścianą komórkową (CEPs) [Sadat-Mekmene i wsp. 2013]. Charakterystyka właściwości proteolitycznych *Lb. helveticus* jak i innych dodatkowych starterów jest bardzo istotna ze względu na możliwość wykorzystania takich kultur jako starterów przemysłowych wpływających na strukturę, smak i zapach serów. Ponadto specyfika i aktywność enzymatyczna proteinaz i peptydaz dodatkowych kultur może również wpływać na uwalnianie bioaktywnych peptydów o korzystnych właściwościach zdrowotnych, co może mieć znaczenie w produkcji funkcjonalnych produktów mlecznych. W związku z powyższym kolejnym podjętym przeze mnie kierunkiem badawczym było określenie wpływu dodatkowego ogrzewanego startera XT-312 z zastosowaniem stosunkowo wysokich parametrów obróbki cieplnej oraz probiotycznego szczepu *Lb. helveticus* LH-B01 na wybrane cechy fizykochemiczne, mikrobiologiczne oraz aktywność proteolityczną i inhibitorów ACE w modelach serów (publikacja H3).

Nie stwierdzono wpływu dodatkowego ogrzewanego startera XT-312 oraz *Lb. helveticus* LH-B01 na zawartość wody, białka i tłuszczu, wody w beztłuszczowej masie sera i tłuszczu w suchej masie sera w badanych modelach serów w porównaniu do modeli serów kontrolnych.

Miarą stopnia dojrzewania sera są zmiany zawartości różnych form substancji azotowych w czasie dojrzewania [Benfeldt i Sorensen 2001]. Pierwotną proteolizę w serach dojrzewających określa zawartość azotu rozpuszczalnego (SN), pośrednią proteolizę - zawartość azotu rozpuszczalnego w kwasie trichlorooctowym (TCA-SN), a zaawansowaną proteolizę - zawartość azotu rozpuszczalnego w kwasie fosforowolframowym (PTA-SN) [McSweeney i Fox 1997]. Zawartość SN (w przeliczeniu na azot całkowity) w modelach serów zawierała się w zakresie 8,67 - 30,6%. Zawartość SN wzrastała progresywnie w czasie dojrzewania we wszystkich modelach serów. Po 1 tygodniu dojrzewania zawartość SN w modelach serów z dodatkowym ogrzewanym w temperaturze 60, 65, 70 i 75 °C starterem XT-312 była podobna, ale statystycznie wyższa w porównaniu do pozostałych modeli serów. W przypadku modeli serów zawierających *Lb. helveticus* LH-B01, stwierdzono wzrost zawartości substancji azotowych rozpuszczalnych w czasie dojrzewania prawie o 22 pkt %-owe między 1 a 5 tygodniem dojrzewania. W modelach serów otrzymanych z dodatkiem ogrzewanego startera najwyższy wzrost zawartości SN między 1 a 5 tygodniem dojrzewania stwierdzono w przypadku modeli serów z dodatkowym XT-312 ogrzewanym w temperaturze 55 °C, który wynosił około 17 pkt %-owych. Stwierdzono, że im wyższa była temperatura ogrzewania dodatkowego startera XT-312, tym mniejszy był wzrost zawartości SN między pierwszym a 5 tygodniem dojrzewania w badanych modelach serów. Po 5 tygodniach dojrzewania modele serów zawierające dodatkowe *Lb. helveticus* LH-B01 charakteryzowała najwyższa zawartość SN spośród wszystkich modeli serów. Szczepy *Lb. helveticus* mogą być stosowane w otrzymywaniu fermentowanych produktów mlecznych jako kultury starterowe podstawowe lub dodatkowe, ze względu na ich zdolność do ukwaszania mleka, tworzenia bioaktywnych peptydów oraz związków aromatycznych [Sadat-Mekmene i wsp. 2011a, Tellez i wsp. 2010]. Ponieważ mleko surowe nie zawiera wystarczającej ilości wolnych aminokwasów i peptydów niskocząsteczkowych, które są niezbędne do wzrostu *Lb. helveticus* dlatego bakterie te potrzebują aktywnego systemu proteolitycznego do zapoczątkowania hydrolizy białek mleka do peptydów i aminokwasów. Obok *Lc. lactis*, *Lb. helveticus* jest określany jako jeden z najbardziej proteolitycznych gatunków LAB a wyjaśnić to można obecnością kilku genów tworzących jego system proteolityczny. Ten stosunkowo silny system proteolityczny, przyczynia się do uwalniania krótkich peptydów i aminokwasów z matrycy kazeinowej i składa się z proteinaz związanych ze ścianą komórkową (CEPs), systemów transportu oligopeptydów do wnętrza komórki oraz różnorodnych wewnątrzkomórkowych peptydaz o odmiennej, czasem częściowo pokrywającej się specyficzności względem wolnych aminokwasów [Genay i wsp. 2009, Sadat-Mekmene i wsp. 2011b]. Powyższe względy mogą uzasadniać intensywniejsze przemiany proteolityczne zachodzące w czasie dojrzewania modeli serów otrzymanych z dodatkiem *Lb. helveticus* LH-B01 w porównaniu do pozostałych modeli serów.

TCA-SN odzwierciedla wtórny hydrolityczny rozkład białek kazeinowych na prostsze, rozpuszczalne substancje [Liu i wsp. 2015]. Zawartość TCA-SN w modelach serów zwiększała się podczas dojrzewania. Po 5 tygodniach dojrzewania wyższą zawartością TCA-SN charakteryzowały się modele serów z dodatkiem *Lb. helveticus* LH-B01 w porównaniu zarówno do modeli serów kontrolnych jak i z dodatkiem startera XT-312 poddanego obróbce cieplnej. Może to wynikać z większego zakresu pierwotnej proteolizy, której produkty stanowiły substraty późniejszej hydrolizy prowadzonej przez peptydazy *Lb. helveticus*. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają dane literaturowe, które wskazują, że po utworzeniu przez enzymy podpuszczki rozpuszczalnych peptydów ulegają one szybkiej hydrolizie pod wpływem peptydaz bakteryjnych [Munir i wsp. 2020, Ong i wsp. 2006, Zhang i wsp. 2021].

PTA-SN reprezentowany jest głównie przez aminokwasy i bardzo małe peptydy, których zawartość jest ściśle skorelowana ze smakiem serów dojrziałych [Law 1987]. Zawartość PTA-SN we wszystkich modelach serów zwiększała się wraz z postępowaniem dojrzewania. Modele serów zawierające dodatkowe *Lb. helveticus* LH-B01 charakteryzowały się wyższą (2–2,5-krotnie) zawartością PTA-SN po 3 i 5 tygodniach dojrzewania w porównaniu do pozostałych modeli serów. We wszystkich modelach serów z dodatkowym starterem XT-312 poddanym obróbce cieplnej stwierdzono zbliżoną zawartość PTA-SN niezależnie od temperatury obróbki cieplnej, jak również w modelach serów kontrolnych. Oznacza to, że zastosowanie dodatkowego poddanego obróbce cieplnej startera XT-312 nie zwiększało zawartości PTA-SN w modelach serów.

Ogólną aktywność proteolityczną w badanych modelach serów określano z wykorzystaniem metody z dialdehydem o-ftalowym (OPA), w której oznacza się uwalniane grupy  $\alpha$ -aminowe. Wskaźnik ten zwiększał się wraz z czasem dojrzewania we wszystkich modelach serów. Modele serów zawierające *Lb. helveticus* oraz modele z dodatkowym ogrzewanym w temperaturze 70 lub 75 °C starterem XT-312 charakteryzowały się najwyższą aktywnością proteolityczną po 5 tygodniach dojrzewania. Natomiast najniższą aktywność proteolityczną stwierdzono w kontrolnych modelach serów i modelach otrzymanych z dodatkiem startera XT-312 ogrzewanego w temperaturze 55 °C.

Ogólna aktywność proteolityczna w badanych modelach serów z dodatkowym ogrzewanym starterem XT-312 po 5 tygodniach dojrzewania była większa im wyższa była temperatura ogrzewania dodatkowego startera. Świadczy to o zachowaniu aktywności proteolitycznej dodatkowego startera nawet po zastosowaniu wysokiej obróbki cieplnej lub oddziaływaniem takiego startera na bakterie wchodzące w skład startera podstawowego, wpływając pośrednio na ich sumaryczną aktywność proteolityczną. W badaniach z zakresu sposobów przyspieszania dojrzewania serów stosowano temperaturę ogrzewania dodatkowego startera w zakresie 50–72 °C, najczęściej w czasie 10–20 sekund [Klein i Lortal 1999]. Otrzymane wyniki wskazują, że ogrzewanie nawet w wyższej temperaturze i w czasie 15 minut skutecznie przyspieszało proteolizę w otrzymanych modelach serów.

Po 5 tygodniach dojrzewania najwyższą aktywność proteolityczną wykazywały modele serów z dodatkiem *Lb. helveticus* LH-B01. Podobną zależność stwierdzili Poveda i wsp. [2015] w serach otrzymanych z dodatkiem probiotycznego szczepu *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* posiadają silne zdolności proteolityczne i są wykorzystywane w produkcji serów w celu przyspieszenia dojrzewania oraz do tworzenia związków zapachowych [Bergamini i wsp. 2006]. Z kolei Garabal i wsp. [2008] uzyskali podobną aktywność proteolityczną *Lc. lactis* i mezofilnych względnie heterofermentatywnych pałeczek mlekowych. Farkye i wsp. [1995] wyższą średnią zawartość wolnych aminokwasów stwierdzili w modelach serów otrzymanych z dodatkiem termofilnych pałeczek mlekowych (*Lb. delbrüeckii* ssp. *bulgaricus* i *Lb. helveticus*) w porównaniu do serów z dodatkiem *Lactococcus* i NSLAB. Wysoka aktywność proteolityczna termofilnych pałeczek mlekowych w porównaniu do innych bakterii mlekowych może wynikać z faktu, iż wykazują one silniejszą aktywność peptydazową jak również aktywność wobec kazeiny uwalniając z niej aminokwasy, które dalej przekształcane są w związki kształtujące cechy sensoryczne serów. Modele serów otrzymane z dodatkiem *Lb. helveticus* LH-B01 charakteryzowały się wyższą aktywnością proteolityczną zarówno w porównaniu do modeli serów z dodatkiem ogrzewanego startera XT-312 jak i kontrolnych. Wynika to zapewne z faktu, że do ich wyrobu wykorzystano *Lb. helveticus* LH-B01, który określany jest jako jeden z najbardziej proteolitycznych spośród LAB [Genay i wsp. 2009]. Ardö i wsp. [1989] podają, że dodatkowe ogrzewane w temperaturze 67 °C w czasie 10 sekund kultury bakterii *Lb. helveticus* wpływały na intensyfikację procesu proteolizy i cech smakowo-zapachowych w niskotłuszczowych serach typu Cheddar. Z reguły dodatek różnych ogrzewanymi kultur bakterii



mlekowych w wyrobie sera intensyfikował proteolizę, wywierał pozytywny wpływ na cechy zapachowe jednak wywołując czasami wystąpienie goryczki w serach dojrzałych [Klein i Lortal 1999].

Przedstawiane w literaturze dane wykazują duże różnice w aktywności proteolitycznej wśród szczepów bakterii mlekowych. Dzięki tak dużym rozbieżnościom jest wiele możliwości ich stosowania i doboru jako kultur dodatkowych. Jednocześnie jednak szczepo – zależność aktywności proteolitycznej może stwarzać trudności w doborze odpowiedniego składu drobnoustrojów. Różna dynamika procesów proteolitycznych w trakcie dojrzewania sera najprawdopodobniej wynika z ogromnej różnorodności (kombinacji) stosowanych do ich wyrobu starterów podstawowych, dodatkowych, różnorodności szczepów, obecności bakterii NSLAB, a także początkowego pH i zawartości wody w serach.

Modele serów zawierające aktywne lub nieaktywne dodatkowe kultury bakterii wykazywały wyższą aktywność inhibicji ACE w porównaniu z modelami serów kontrolnych po 5 tygodniach dojrzewania. Zgodnie z opisanym wcześniej schematem proteolizy, aktywność inhibicji ACE wraz z wydłużaniem czasu dojrzewaniem wzrastała istotnie. Aktywność inhibitorów ACE była najwyższa po 5 tygodniach dojrzewania w modelach serów zawierających *Lb. helveticus* LH-B01 i poddanym obróbce cieplnej w 65 °C starterem XT-312. Wzrost aktywności inhibitorów ACE podczas dojrzewania jest zgodny z moimi wcześniejszymi badaniami [publikacja H1, H2] jak i innych badaczy [Baptista i wsp. 2018, Munir i wsp. 2020, Ong i Shah 2008, Sheibani i wsp. 2015].

W modelach serów oznaczono także ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD), liczbę bakterii z rodzaju *Lactococcus* oraz niestarterowych bakterii kwasu mlekowego (NSLAB). OLD we wszystkich badanych modelach serów mieściła się w zakresie 9-10 log jtk/g. Zarówno w jednodniowych modelach serów jak i w tych po 5 tygodniach dojrzewania otrzymanych z dodatkową kulturą *Lb. helveticus* LH-B01 stwierdzono bardzo wysoką OLD. Modele serów kontrolne charakteryzowała wyższa OLD przez cały okres dojrzewania w porównaniu do serów z dodatkowym ogrzewanym starterem XT-312. Silniejsza proteoliza w modelach serów z dodatkowym ogrzewanym starterem XT-312 w porównaniu z modelami serów kontrolnych wynikała najprawdopodobniej ze zwiększonej masy komórek bakteryjnych już po ich otrzymaniu, jak również z szybszego obumierania komórek bakterii, ich lizy i uwalniania enzymów proteolitycznych. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku liczby bakterii z rodzaju *Lactococcus*. Najwyższą liczbę bakterii z rodzaju *Lactococcus* stwierdzono w modelach serów z dodatkiem *Lb. helveticus* LH-B01 w porównaniu z modelami serów zawierających dodatkowy ogrzewany starter XT-312 w całym okresie dojrzewania. Najniższą liczbę bakterii z rodzaju *Lactococcus* po 5 tygodniach stwierdzono w modelach serów z dodatkowym starterem XT-312 ogrzewanym w temperaturze 70 i 75 °C. W modelach serów z dodatkowym ogrzewanym starterem w miarę podwyższania temperatury ogrzewania dodatkowego startera, liczba bakterii z rodzaju *Lactococcus* malała.

Początkowa liczba NSLAB w badanych modelach serów mieściła się w zakresie 2-4 log jtk/g sera, a po 5 tygodniach dojrzewania wzrosła do poziomu 8-9 log jtk/g sera. Wyższą liczbę NSLAB pod koniec dojrzewania stwierdzono w modelach serów kontrolnych oraz z dodatkiem *Lb. helveticus* LH-B01 w porównaniu z modelami serów z dodatkowym ogrzewanym starterem XT-312. NSLAB stanowią mikroflorę zanieczyszczającą sery, pochodzą z mleka surowego lub reinfekcji popasteryzacyjnej mleka [Hynes i wsp. 2001]. Nawet niewielka liczba NSLAB może przetrwać proces pasteryzacji i rozwijać się w czasie dojrzewania osiągając liczbę 6-8 log jtk/g w zależności od czasu i temperatury dojrzewania [Burns i wsp. 2012, Van Hoorde i wsp. 2010]. W czasie dojrzewania serów NSLAB rozwijają się znacznie szybciej niż bakterie starterowe stając się mikroflorą dominującą po autolizie komórek bakterii startera [Crow i wsp. 2001]. Do NSLAB zalicza się głównie heterofermentatywne mezofilne pałeczki mlekowe (*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* oraz *Lb. plantarum*) choć obecność enterokoków, pediokoków i *Leuconostoc* jest

również stwierdzana. Początkowa liczba NSLAB jest różna w różnych serach. W przypadku serów typu szwajcarskiego początkowa liczba NSLAB wynosi 10 jtk/g i wzrasta w trakcie dojrzewania osiągając po 10 tygodniach wartość 6 log jtk/g. Z kolei sery Cheddar bezpośrednio po wyrobie zawierają nawet 8 log jtk/g NSLAB [Beresford i Williams 2004, Burns i wsp. 2012, Hynes i wsp. 2001]. Starter stosowany w produkcji sera ma wpływ na tempo wzrostu i ostateczną liczbę NSLAB podczas dojrzewania. Bakterie kwasu mlekowego są w stanie rosnąć na lizatach z komórek *Lactococcus*, co sugeruje, że liza komórek startera może dostarczać składniki odżywcze dla wzrostu NSLAB w serach. Niektórzy autorzy uważają, że wysoki poziom wolnych aminokwasów wytwarzanych przez peptydazy uwolnione po śmierci komórek starterów może stymulować wzrost NSLAB [Crow i wsp. 1995, Lane i wsp. 1997]. W niniejszych badaniach zaobserwowano, że dodatkowy ogrzewany starter XT-312 wpływał na obniżanie liczebności NSLAB wraz ze wzrostem temperatury ogrzewania dodatkowego startera. Modele serów z dodatkiem ogrzewanego startera charakteryzowała mniejsza liczba NSLAB zarówno w porównaniu do serów kontrolnych jak i serów otrzymanych z dodatkiem bakterii *Lb. helveticus* LH-B01 co może wskazywać, że wniesiony dodatkowy ogrzewany starter hamował rozwój nie tylko podstawowego aktywnego startera, ale również NSLAB. Stwierdzono wyższą liczbę zarówno NSLAB, OLD i bakterii z rodzaju *Lactococcus* w modelach serów z dodatkiem aktywnych bakterii *Lb. helveticus* LH-B01, co może świadczyć o stymulowaniu przez nie wzrostu mikroflory starterowej i towarzyszącej w badanych modelach serów i być może tworzeniu dogodniejszych warunków dla ich wzrostu.

Zastosowanie dodatkowych kultur bakterii zarówno w postaci aktywnej fermentacyjnie kultury *Lb. helveticus* LH-B01 jak i ogrzewanego nieaktywnego fermentacyjnie startera XT-312 zwiększało zawartość związków azotowych rozpuszczalnych i ogólną aktywność proteolityczną w badanych modelach serów, co świadczy o przyspieszaniu procesu dojrzewania. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że przyspieszanie procesu dojrzewania sera zachodzi również w przypadku stosunkowo wysokiego ogrzewania dodatkowego startera (65-75 °C/15 min). Stosunkowo długie ogrzewanie dodatkowego startera (kilkanaście minut) ma pewną praktyczną zaletę. Taką obróbkę cieplną łatwo i praktycznie bezinwestycyjnie można przeprowadzić w zbiorniku, w którym jest przygotowywany zakwas. Stosowanie bardzo krótkiego czasu ogrzewania dodatkowych starterów wymaga urządzeń działających w systemie przepływowym, co wiąże się z inwestycjami, wymaga automatyki i powodować może dodatkowe koszty. Ponadto zastosowanie dodatkowego poddanego obróbce cieplnej startera mogło również skutkować szybszą lizą komórek startera podstawowego, co także intensyfikowało procesy proteolityczne w trakcie dojrzewania modeli serów.

#### 4.3.4. Zdolność tworzenia bioaktywnych peptydów (L-karnozyny i anseryny), wolnych aminokwasów oraz amin biogennych przez wybrane szczepy bakterii mlekowych w modelach serów

Mikroorganizmy wykazują różną zdolność wytwarzania zarówno amin biogennych jak i substancji bioaktywnych w matrycy spożywczej w tym również w serach, na co znacząco mają wpływ panujące w nich warunki środowiskowe (np. zawartość białka, NaCl, pH,  $a_w$ ). Istotne jest, zatem określanie zdolności drobnoustrojów wytwarzania amin biogennych jak również substancji bioaktywnych nie tylko w warunkach *in vitro*, ale także w rzeczywistym środowisku produktów spożywczych. W związku z powyższym kolejnym tematem podjętych przez mnie badań było określenie składu wolnych aminokwasów, zawartości bioaktywnych dipeptydów (L-karnozyny i anseryny) oraz amin biogennych w modelach serów otrzymanych z dodatkiem różnych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (publikacja H4). Do określenia zawartości aminokwasów, amin biogennych i bioaktywnych peptydów w tych modelach serów wykorzystano metodę chromatografii cieczowej w połączeniu z tandemową spektrometrią mas

z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie i pułapką jonową (liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry - LC-ESI-IT-MS/MS).

Zawartość wolnych aminokwasów (FAA - free amino acid) i całkowita zawartość wolnych aminokwasów (TFAA - total free amino acid) była zależna od zastosowanego dodatkowego szczepu *Lactobacillus*. We wszystkich modelach serów w czasie 5 tygodni dojrzewania nie stwierdzono obecności treoniny i cystyny. Modele serów zawierające *Lb. acidophilus* 2499 charakteryzowała wysoka zawartość aminokwasów przez 5 tygodni dojrzewania. Największą zawartość po 5 tygodniach dojrzewania stwierdzono w przypadku asparaginy, kwasu glutaminowego oraz lizyny. Zawartość histydyny zmalała 3-krotnie do poziomu 43 mg/kg po 5 tygodniach dojrzewania natomiast lizyny wzrosła 4-krotnie osiągając po 5 tygodniach wartość 137 mg/kg. Najbardziej zmienna w czasie dojrzewania modeli serów z *Lb. acidophilus* 2499 była zawartość kwasu glutaminowego, która wzrosła ponad 10 - krotnie do 571 mg/kg po 5 tygodniu. Modele serów z *Lb. acidophilus* wykazywały najwyższą zawartość kwasu glutaminowego po 5 tygodniach dojrzewania w porównaniu do pozostałych badanych modeli serów. Można to uznać za korzystną cechę, ponieważ kwas glutaminowy odpowiada za intensyfikację smaku sera [Michaelidou i wsp. 2003]. TFAA w modelach serów z dodatkiem *Lb. acidophilus* 2499 po 5 tygodniach dojrzewania była największa wśród badanych modeli serów (1597 mg/kg). Modele serów zawierające dodatkowo *Lb. rhamnosus* 489 cechowała również wysoka całkowita zawartość aminokwasów po 5 tygodniach dojrzewania, jak w przypadku modeli serów z dodatkiem *Lb. acidophilus* 2499. Asparagina, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy i walina to aminokwasy, które stanowiły największy udział wśród aminokwasów w modelach serów z *Lb. rhamnosus* 489. Modele serów z *Lb. rhamnosus* 489 cechowała najwyższa zawartość proliny (97 mg/kg) po 5 tygodniach dojrzewania w porównaniu do pozostałych badanych modeli serów, co może wpływać na pozytywne walory smakowo zapachowe z uwagi na to, że prolina odpowiada za słodki smak serów [Madrau i wsp. 2006]. Ponadto modele serów z *Lb. rhamnosus* 489 charakteryzowały się najwyższą zawartością ornityny w porównaniu do pozostałych modeli serów co jest interesujące z uwagi na opisywane jej właściwości uspokajające [Kurata i wsp. 2011]. W modelach serów z *Lb. rhamnosus* 489 stwierdzono największy (około 3 - krotny) przyrost TFAA w czasie dojrzewania (do 1556 mg/kg po 5 tygodniach dojrzewania).

Modele serów z dodatkiem *Lb. delbrüeckii* 490 charakteryzowała nieco niższa zawartość aminokwasów niż modeli opisanych powyżej. Modele serów z *Lb. delbrüeckii* 490 charakteryzowała najwyższa zawartość histydyny po 5 tygodniach dojrzewania w porównaniu do pozostałych badanych modeli serów.

Modele serów z dodatkiem *Lb. casei* 2639 cechowała najniższa TFAA po 5 tygodniach dojrzewania (611 mg/kg) spośród wszystkich badanych modeli serów łącznie z kontrolnymi. Żaden aminokwas w tych modelach serów nie występował w ilości  $\geq 100$  mg/kg.

W modelach serów zawierających szczepy *Lb. acidophilus* 2499, *Lb. rhamnosus* 489 lub *Lb. delbrüeckii* 490 stwierdzono największą zawartość kwasu glutaminowego. Z kwasu glutaminowego na drodze dekarboksylacji katalizowanej przez enzym dekarboksylazę glutaminową wytwarzany jest przez LAB kwas gamma-aminomasłowy występujący w fermentowanych produktach mlecznych [Tillakaratne i wsp. 1995]. GABA jest hamującym neuroprzekaznikiem w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków, syntetyzowanym w organizmie podczas snu. Przypuszcza się, że GABA bierze udział w poprawie jakości snu obserwowanej po spożyciu fermentowanych produktów mlecznych [Cui i wsp. 2008, 2020]. Wysoka zawartość kwasu glutaminowego w otrzymanych modelach serów może być korzystna z uwagi na możliwość jego przemiany za pośrednictwem LAB do GABA, a tym samym poprawę jakości snu osób spożywających taką żywność.

Zawartość FAA w serach zależy jest w znacznym stopniu od aktywności proteolitycznej mikroorganizmów w nich obecnych. Enzymy proteolityczne pochodzenia mikrobiologicznego odpowiedzialne są za rozszczepianie końcowych wiązań peptydowych w białkach i peptydach, co wiąże się z uwalnianiem FAA. Istotne są także dalsze przemiany FAA i tworzenie innych produktów takich jak substancje aktywne sensorycznie czy aminy biogenne [Johnson i Steele 2013]. Skład FAA w różnych gatunkach serów był przedmiotem wielu badań, a ich zawartość w serach zależała od technologii wyrobu (rodzaj skrzepu, dodatkowych proteinaz, starterów, warunków dojrzewania) czasu dojrzewania oraz zakresu i przebiegu proteolizy [Diana i wsp. 2014, Flasarová i wsp. 2016, Pachlová i wsp. 2018, Poveda i wsp. 2015, Redruello i wsp. 2013, Renes i wsp. 2014].

Występowanie amin biogennych w serach jest dobrze udokumentowane a ich obecność w serach przypisywana jest głównie aktywności NSLAB [Diaz i wsp. 2015, Romano i wsp. 2014]. Pomimo, że w serach różne mikroorganizmy w tym bakterie Gram(-) są w stanie wytwarzać AB, to właśnie gatunki z rodzaju *Lactobacillus*, takie jak *Lb. helveticus*, *Lb. buchneri* i *Lb. curvatus*, uznaje się za odpowiedzialne za akumulację tych substancji w serach [Burdychova i wsp. 2007, Ladero i wsp. 2008, Linares i wsp. 2014, Pachlová i wsp. 2018, Spano i wsp. 2010, Spizzirri i wsp. 2013]. Różnice w zawartości AB w modelach serów były głównie związane z czasem ich dojrzewania, jak również z zastosowanym dodatkowym szczepem *Lactobacillus*. Całkowita zawartość AB w badanych modelach serów po 5 tygodniach dojrzewania mieściła się w zakresie od 48 mg/kg - dla modeli serów z dodatkiem *Lb. casei* 2639 do 77 mg/kg - dla modeli serów zawierających *Lb. rhamnosus* 489. W naszych badaniach zastosowane szczepy *Lb. delbrüeckii* 490 i *Lb. acidophilus* 2499 wpływały na obniżenie zawartości amin biogennych po 5 tygodniach dojrzewania. Zdolność degradacji AB *in situ* przez niektóre szczepy LAB stwierdzali wcześniej także inni autorzy [Alvarez i Moreno-Arribas 2014, Herrero-Fresno i wsp. 2012, Ladero i wsp. 2014]. Natomiast w przypadku modeli serów kontrolnych oraz zawierających dodatkowo *Lb. rhamnosus* 489 i *Lb. casei* 2639 następował wzrost zawartości AB w czasie 5 tygodni dojrzewania. Zastosowanie szczepów degradujących aminy biogenne może być szczególnie korzystne podczas produkcji serów otrzymywanych z mleka surowego, w których specyficzna mikroflora zarówno niestarterowa jak i nie mlekowa ma bardzo duże znaczenie w uzyskaniu odpowiednich cech organoleptycznych produktu końcowego.

Jako mikroorganizmy wytwarzające histaminę opisywane są różne bakterie kwasu mlekowego - również te, które są wykorzystywane w produkcji serów (np. *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* i *Lb. helveticus*) [Comas-Basté i wsp. 2020]. W największej ilości w badanych modelach serów występowała histamina, która wraz z tyraminą opisywana jest jako najobficiej występująca AB w serach [Poveda i wsp. 2015, Redruello i wsp. 2013]. Modele serów zawierające dodatkowe *Lb. rhamnosus* 489 charakteryzowały się wyższą zawartością histaminy po 5 tygodniach dojrzewania niż pozostałe modele serów. Tyramina, putrescyna, kadaweryna, spermidyna i spermina występowały na stosunkowo niskim poziomie (< 7 mg/kg) we wszystkich modelach serów w czasie dojrzewania. Putrescyna i kadaweryna odpowiadają za nietypowy smak serów [Alvarez i Moreno-Arribas 2014], a wykrywane są w znacznych ilościach w serach przejrzalnych [Moret i wsp. 1992] i wytwarzanych z mleka surowego [Novella-Rodríguez i wsp. 2004]. Występowanie kadaweryny w serach związane jest z działaniem bakterii zanieczyszczających i wysoka jej zawartość w serach świadczy o złej jakości higienicznej surowca [Fernández i wsp. 2007]. W przypadku modeli serów z *Lb. rhamnosus* 489 po 5 tygodniach dojrzewania nie stwierdzono występowania putrescyny, sperminy, tyraminy, w przypadku modelu sera z *Lb. delbrüeckii* 490: sperminy i tyraminy, z *Lb. acidophilus* 2499: putrescyny, tryptaminy i tyraminy, z *Lb. casei* 2639: tryptaminy i tyraminy, natomiast w modelach serów kontrolnych: sperminy i tryptaminy.

Z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności histamina i tyramina uważane są za najbardziej toksyczne i szczególnie niekorzystne. Poziom toksykologiczny dla amin biogennych nie został ustalony w prawodawstwie europejskim. Uważa się, że zawartość AB w żywności <100 mg/kg, nie stanowi istotnego zagrożenia dla zdrowych konsumentów, ponieważ związki te są metabolizowane przez enzymy detoksykacyjne w jelitach. Z kolei wyższe zawartości amin biogennych w żywności mogą wywoływać niepożądane objawy psycho- i wazoaktywne [Buňková i wsp. 2013].

Zawartość poszczególnych bioaktywnych peptydów (BP - bioactive peptide) i ich całkowita zawartość (TBP - total bioactive peptide) była zależna od zastosowanych dodatkowych szczepów LAB. Podobnie jak w przypadku zawartości TFAA po 5 tygodniach dojrzewania najwyższą zawartość TBP (136 mg/kg) stwierdzono w modelach serów z dodatkiem *Lb. acidophilus* 2499. Te modele serów charakteryzowała również najwyższa zawartość L-karnozyny i anseryny po 5 tygodniach dojrzewania w porównaniu do pozostałych badanych modeli serów. Synteza L-karnozyny w mięśniach szkieletowych człowieka zależy od dostępności w organizmie aminokwasów: alaniny i histydyny. W modelach serów z *Lb. acidophilus* 2499 po 5 tygodniach dojrzewania stwierdzono najwyższą zawartość alaniny, na co mogła mieć wpływ najwyższa zawartość L-karnozyny i anseryny w tych właśnie modelach serów. Z uwagi na to sery poza podstawową wartością żywieniową mogą wykazywać dodatkowe korzyści zdrowotne. W modelach serów z dodatkiem *Lb. delbrückii* 490 oraz *Lb. casei* 2639 nie stwierdzono L-karnozyny w czasie dojrzewania. Z kolei w modelach serów kontrolnych L-karnozyna nie była obecna już po 3 tygodniach dojrzewania.

Stwierdzone poziomy anseryny i L-karnozyny w badanych modelach serów nie były zbyt wysokie w porównaniu do innych produktów spożywczych (240 – 7110 mg/kg) [Corona i wsp. 2011, Mori i wsp. 2015]. Należy jednak wziąć pod uwagę, że przedstawiana w piśmiennictwie zawartość L-karnozyny i anseryny dotyczy głównie różnych produktów mięsnych oraz ryb, w których wysokich wartości należy oczekiwać, ze względu na występowanie tych związków w mięśniach. Podejrzewa się, że karnozyna odgrywa kluczową rolę biologiczną w mięśniach a jej obecność w diecie może zapobiegać chorobom neurodegeneracyjnym [Corona i wsp. 2011, Mori i wsp. 2015]. Dlatego też występowanie bioaktywnych peptydów w serach jest jak najbardziej korzystne a określanie specyficznego działania szczepów LAB stosowanych w produkcji serów wydaje się mieć istotne znaczenie.

Uzyskane wyniki badań w publikacji H4 wpłynęły na podjęcie kolejnych badań mających na celu określenie zawartości wolnych aminokwasów (w tym ornityny), amin biogennych oraz bioaktywnych dipeptydów (L-karnozyny i anseryny) w modelach serów otrzymanych z dodatkiem różnych szczepów *Lc. lactis*, w tym szczepów nizynotwórczych (*Lc. lactis* 11454, *Lc. lactis* 2379) oraz takich które nie wytwarzają bakteriocyn (*Lc. lactis* 476) (publikacja H5). Do określenia zawartości aminokwasów, amin biogennych i bioaktywnych peptydów wykorzystano LC-ESI-IT-MS/MS.

Nizyna jest bakteriocyną polipeptydową wytwarzaną przez niektóre szczepy *Lactococcus lactis*, która nie wykazuje lub wykazuje słabe działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii Gram(-), pleśni i drożdży, ale jest skuteczna względem bakterii Gram(+), w tym bakterii chorobotwórczych (*S. aureus*, *L. monocytogenes* i *C. botulinum*) [Aly i wsp. 2012]. Stosowana jest ona w przemyśle spożywczym jako substancja konserwująca (E234). W krajach Unii Europejskiej nizynę można stosować w produkcji gęstych kremów, serów niedojrzewających (tylko mascarpone), serów dojrzewających, produktów mięsnych poddanych obróbce cieplnej, pasteryzowanych jaj w płynie oraz deserów, takich jak puddingi z kaszy mannej i tapioki [Rozporządzenie (WE) 1333/2008]. Zastosowanie szczepów bakterii wytwarzających bakteriocynę do indukowania lizy LAB jest stosunkowo nowym sposobem przyspieszania dojrzewania serów. Liza komórek bakterii mlekowych uwalnia do matrycy sera peptydazy, które są enzymami wewnątrzkomórkowymi i dzięki temu sprzyja dostępowi tych enzymów do substratów [Chapot- Chartier i wsp. 1994, Garde i wsp. 2002,

Martinez-Cuesta i wsp. 2001, Perin i wsp. 2015, Rossi i Veneri 2016]. Takie rozwiązanie niesie za sobą wiele korzyści. Po pierwsze, nie ma ograniczeń prawnych, które zabraniają stosowania szczepów nizynotwórczych w produkcji serów [Galvez i wsp. 2007]. Po drugie, nie są potrzebne żadne dodatkowe operacje technologiczne ani sprzęt. Ponadto nizyna jest wówczas rozprowadzana równomiernie w matrycy sera. Dodatkowo obecność bakteriocyny zapewnia bezpieczeństwo i jakość higieniczną gotowego produktu.

Zastosowanie *L. lactis* subsp. *lactis* wytwarzającego nizynę pozwoliło na ograniczenie zawartości amin biogennych w serach produkowanych z surowego mleka koziego [Perin i wsp. 2015], co sugeruje, że bakterie bakteriocynogenne mogą być również wykorzystywane do ograniczania powstawania niepożądanych związków w serach. Rossi i Veneri [2016] wykazali, że kultury bakteriocynogenne nie wykazywały działania hamującego wobec NSLAB, które uczestniczą w dojrzewaniu i wytwarzaniu typowych cech sensorycznych niektórych odmian serów. Z kolei badania nad wykorzystaniem nizynotwórczych szczepów w produkcji serów Cheddar, w celu ograniczenia rozwoju NSLAB odpowiedzialnych za wywoływanie wad tych serów wykazały skuteczność ich stosowania [Ryan i wsp. 2001].

Głównym problemem związanym z zastosowaniem bakterii wytwarzających bakteriocyny w produkcji żywności fermentowanej, w tym także w serach, jest ich skuteczność przeciwdrobnoustrojowa *in situ*, na którą mogą niekorzystnie wpływać różne czynniki, takie jak wiązanie bakteriocyn ze składnikami żywności, ich dezaktywacja przez enzymy proteolityczne oraz właściwości fizyczne żywności (np. pH, NaCl, zawartość tłuszczu) [Aly i wsp 2012, Settanni i wsp. 2004]. Wiedza o wpływie dodatkowych bakteriocynogennych szczepów bakterii mlekowych na SLAB i NSLAB w czasie produkcji i dojrzewania serów, a także na cechy jakościowe tych produktów jest stosunkowo mała. Z tego względu uzasadnione było podjęcie badań określających wpływ nizynotwórczych szczepów LAB na powstawanie wolnych aminokwasów, amin biogennych i bioaktywnych peptydów w modelach serów.

Modele serów zawierające dodatkowe bakterie z rodzaju *Lactococcus* charakteryzowała duża zmienność pod względem zawartości wolnych aminokwasów w trakcie dojrzewania. W przypadku wszystkich badanych modeli serów nie wykazano obecności treoniny i cystyny. W największych ilościach, niezależnie od czasu dojrzewania i zastosowanych szczepów *Lc. lactis*, występowała asparagina (69-187 mg/kg). Najniższą zawartość w badanych modelach serów stwierdzono w przypadku takich aminokwasów jak alanina, arginina, glutamina, glicyna, metionina, seryna, tryptofan, tauryna oraz cytrulina (21-35 mg/kg). Największe zróżnicowanie zawartości stwierdzono dla kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, histydyny, lizyny, tyrozyny, sarkozyny i ornityny w badanych modelach serów w trakcie dojrzewania.

Degradacja białek mleka i wzrost zawartości FAA w znacznej mierze zależy od aktywności mikroorganizmów, szczególnie laktokoków, jak również od ich układu enzymatycznego uwalnianego po lizie komórek [Johnson i Steele 2013]. W modelach serów z dodatkiem nizynotwórczych *Lc. lactis* 11454 po 5 tygodniach dojrzewania wykazano stosunkowo niską (poniżej 34 mg/kg) zawartość argininy, glicyny, metioniny, seryny, tauryny i cytruliny. W większej ilości (33-75 mg/kg) występowały aminokwasy takie jak: alanina, kwas asparaginowy, glutamina, izoleucyna, leucyna, lizyna, fenyloalanina i ornityna, natomiast wysokie zawartości powyżej 100 mg/kg stwierdzono w przypadku waliny, histydyny, proliny, asparaginy i kwasu glutaminowego. Modele serów zawierające dodatkowo *Lc. lactis* 2379 charakteryzowała wysoka zawartość asparaginy i kwasu glutaminowego - po 5 tygodniach dojrzewania odpowiednio 141 i 707 mg/kg. W modelach serów zawierających dodatkowe szczepy *Lc. lactis* 476 stwierdzono bardzo wysoką, utrzymującą się na stałym poziomie w czasie dojrzewania zawartość izoleucyny i leucyny, która po 5 tygodniach dojrzewania wynosiła 86 i 110 mg/kg odpowiednio. Zawartość leucyny w tych modelach serów była najwyższa spośród wszystkich badanych modeli serów. Leucyna określana jest jako zasadniczy aminokwas, dzięki któremu można ocenić poziom proteolizy. Leucyna, fenyloalanina i walina uwalniane są

głównie w wyniku proteolizy frakcji  $\alpha_{S1}$ -kazeiny (bogatej w te aminokwasy), który to proces występuje w szerszym zakresie niż proteoliza frakcji  $\beta$ -kazeiny [Pappa i wsp. 2006]. Zawartość ornityny w modelach serów po 5 tygodniach dojrzewania mieściła się w zakresie 36 - 68 mg/kg i była podobna do wartości określanych przez innych autorów [Diana i wsp. 2014, Poveda i wsp. 2015]. Najwyższą zawartością ornityny w czasie dojrzewania charakteryzowały się modele serów zawierające *Lc. lactis* 11454 co jest interesujące z uwagi na opisywane jej funkcje bioaktywne m. in. działanie uspokajające [Kurata i wsp. 2011].

Kwas glutaminowy odpowiada za intensyfikację smaku sera [Michaelidou i wsp. 2003] a jego dużą zawartość określono w modelach serów z dodatkiem *Lc. lactis* 2379. Arginina, która związana jest z gorzkim smakiem serów, występowała w niskich stężeniach (16-20 mg/kg) we wszystkich modelach serów. Z kolei wysoką zawartością proliny (131 mg/kg) cechowały się modele serów z *Lc. lactis* 11454. Można to uznać za korzystną cechę, ponieważ prolina nadaje serom słodki smak i jest szczególnie pożądana np. w serach typu ementaler [Madrau i wsp. 2006].

TFAA w modelach serów kontrolnych wynosiła 801 mg/kg po 5 tygodniach dojrzewania, z kolei w modelach serów z dodatkiem *Lc. lactis* 11454 była prawie 2-krotnie większa i wynosiła 1593 mg/kg. TFAA w modelach serów z dodatkiem *Lc. lactis* 2379 osiągnęła wartość 1438 mg/kg – po 5 tygodniach dojrzewania. Najniższą zawartością TFAA cechowały się modele serów zawierające *Lc. lactis* 476 co było skorelowane z najniższą całkowitą zawartością amin biogennych w tych modelach serów. Być może jest to wynikiem występowania interakcji pomiędzy *Lc. lactis* 476, a szczepami LAB wchodzącymi w skład zastosowanej podstawowej kultury starterowej (CHN-19). Liza komórek SLAB i uwalnianie peptydaz wewnątrzkomórkowych mogła mieć wpływ na wyższą zawartość TFAA w modelach serów z dodatkiem obu badanych szczepów nizynotwórczych *Lc. lactis* 11454 i *Lc. lactis* 2379. Sallami i wsp. [2004] zaobserwowali, że zastosowanie wytwarzającego nizynę szczepu *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* UL719 znacząco zwiększało zawartość wolnych aminokwasów w serach Cheddar, co przypisali przyspieszeniu autolizy pałeczek mlekowych i procesów proteolizy.

We wszystkich modelach serów z dodatkowymi szczepami *Lactococcus* stwierdzono niższą zawartość amin biogennych niż w modelach serów kontrolnych. Świadczy to o tym, że zastosowanie dodatkowych bakterii z rodzaju *Lactococcus* nie przyczyniało się do wzrostu zawartości amin biogennych w serach tylko do ich obniżania. We wszystkich modelach serów przez cały okres dojrzewania nie stwierdzono obecności agmatyny i fenyloetyloaminy. Różnice w zawartości amin biogennych w modelach serów były głównie związane z czasem dojrzewania, jak również z zastosowaniem dodatkowych szczepów *Lactococcus*, co sprzyjać mogło rozwojowi mikroflory proteolitycznej, a tym samym powstawaniu amin biogennych [Spizzirri i wsp. 2013].

Nie wykazano związku między zawartością TFAA a występowaniem amin biogennych w modelach serów. Próbkę charakteryzującą się najwyższą zawartością TFAA nie zawsze wykazywały najwyższą zawartość AB. Przykładem były modele serów kontrolnych, o najwyższej zawartości amin biogennych po 5 tygodniach dojrzewania, które charakteryzowały się jedną z najniższych zawartości TFAA. Potwierdza to zależności opisywane przez innych autorów [Poveda i wsp. 2015], a powodem tego mogą być czynniki środowiskowe takie jak pH, stężenie soli, temperatura, które wpływają na aktywność enzymów dekarboksylujących i mogą mieć istotniejszy wpływ na powstawanie amin biogennych niż dostępność wolnego aminokwasu prekursorowego powstającego w czasie dojrzewania [Joosten i Stadhouders 1987].

Zawartość histaminy podawana przez źródła piśmiennictwa wahała się w bardzo szerokich granicach od <0,03 do 469 mg/kg [Ekici i wsp. 2019, Sagun i wsp. 2005] Z kolei zawartość tyraminy w serach wynosiła nawet 1125 mg/kg [Andic i wsp. 2010]. W niniejszych badaniach, we wszystkich modelach serów w największej ilości spośród różnych AB występowała histamina. Modele serów kontrolnych oraz z *Lc.*

*lactis* 11454 wykazywały wyższą zawartość histaminy (41-42 mg/kg) niż pozostałe modele serów. We wszystkich modelach serów stwierdzono znacznie niższą zawartość tyraminy niż histaminy. Z toksykologicznego punktu widzenia, histamina i tyramina są uważane za najbardziej toksyczne i szczególnie istotne aminy biogenne dla bezpieczeństwa żywności. Ich toksyczność zależy od spożytej ilości oraz indywidualnej wrażliwości organizmu człowieka. Według Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), nie stwierdzono szkodliwych skutków dla zdrowia po spożyciu histaminy w ilości 25-50 mg na osobę na posiłek, a w przypadku tyraminy - 600 mg na osobę na posiłek [EFSA, 2011]. Biorąc pod uwagę te wartości i ilość sera przeciętnie spożywanego podczas posiłku modele serów z dodatkowymi szczepami *Lactococcus* nie stanowiły istotnego zagrożenia dla zdrowia konsumentów.

Putrescyna, kadaweryna, spermidyna i spermina występowały w niewielkich ilościach we wszystkich modelach serów podczas dojrzewania (poniżej 5 mg/kg). Według Komprda i wsp. [2007] średni poziom sperminy i spermidyny w serach typu holenderskiego wynosił odpowiednio 0,2 i 0,3 mg/kg. W serach długo dojrzewających poziom tych amin biogenych jest znacznie wyższy i sięga kilkudziesięciu mg/kg [Spizzirri i wsp. 2013]. Tryptamina nie została wykryta w modelach serów z *Lc. lactis* 11454 w czasie dojrzewania, a w pozostałych modelach serów była obecna w bardzo małych ilościach (2 – 5 mg/kg). Perin i wsp. [2015] zaobserwowali, że po dodaniu wytwarzającego nizinę szczepu *Lc. lactis* subsp. *lactis* GLc05 do serów Minas, zawartość 2-feniloetyloaminy i kadaweryny po 60 dniach dojrzewania była 4-krotnie niższa w porównaniu do serów kontrolnych bez dodatkowych bakterii.

Najwyższą zawartość bioaktywnych peptydów (TBP) podobnie jak TFAA po 5 tygodniach dojrzewania stwierdzono w modelach serów z dodatkiem *Lc. lactis* 11454 (142 mg/kg). Te modele serów charakteryzowała również jedna z wyższych zawartości histydyny po 5 tygodniach dojrzewania w porównaniu do pozostałych modeli serów. Można to uznać za efekt pozytywny z uwagi na to, że dieta bogata w histydynę zwiększa poziom L-karnozyny w mięśniach. Patrząc pod tym kątem sery poza typowymi wartościami żywieniowymi, mogą wykazywać dodatkowe efekty zdrowotne. Jedynie w modelach serów z dodatkowym *Lc. lactis* 11454 po 5 tygodniach dojrzewania stwierdzono obecność L-karnozyny na stosunkowo wysokim poziomie. W pozostałych modelach serów L-karnozyna występowała głównie po 1 tygodniu dojrzewania. Pozostałe modele serów wykazywały po 5 tygodniach dojrzewania podobną zawartość TBP (około 79 mg/kg), która wynikała jedynie z zawartości anseryny, której zawartość utrzymywała się na niezmiennym poziomie w czasie dojrzewania. Zawartość anseryny i L-karnozyny w modelach serów była niewielka w porównaniu do zawartości stwierdzanej w produktach mięsnych i rybach tj. w mięsie kurczaków (2000–7000 mg/kg), wołowinie (200–800 mg/kg) i jagnięcinie (1000 mg/kg) [Mori i wsp. 2015].

#### 4.3.5. Podsumowanie najważniejszych wyników będących przedmiotem osiągnięcia naukowego

Przedstawione w osiągnięciu naukowym stanowiącym cykl publikacji wyniki pogłębiają, a w niektórych aspektach dostarczają również nowej wiedzy na temat wpływu dodatkowych kultur bakterii mlekowych na tworzenie bioaktywnych peptydów, wolnych aminokwasów, amin biogenych oraz na procesy proteolityczne zachodzące w serach w czasie dojrzewania. Dodatkowo, zaprezentowane wyniki mają znaczenie zarówno w obszarze nauk stosowanych - wskazują na możliwość wykorzystania dodatkowych zarówno aktywnych jak i poddanych obróce cieplnej starterów i szczepów bakterii mlekowych w produkcji serów podpuszczkowych dojrzewających w celu przyspieszania ich dojrzewania, zwiększania wartości żywieniowej jak i zdrowotnej serów - jak i w obszarze nauk podstawowych - dostarczają bowiem nowych informacji w zakresie występowania bioaktywnych peptydów (przeciwnadciśnieniowych, L-karnozyny i anseryny), wolnych aminokwasów (w tym ornityny), amin biogenych w modelach serów.



Na podstawie otrzymanych wyników badań można sformułować następujące szczegółowe wnioski dotyczące wpływu zastosowania dodatkowych kultur LAB na proteolizę i dojrzewanie serów:

- Dodatkowe ogrzewane startery oraz aktywne szczepy bakterii z rodzaju *Lactococcus* i *Lactobacillus* nie wpływały na zmianę składu chemicznego modeli serów.

- Zastosowanie dodatkowego ogrzewanego startera oraz wybranych szczepów LAB zwiększało aktywność proteolityczną w modelach serów. Stwierdzono zwiększenie całkowitej zawartości wolnych aminokwasów a także poszczególnych aminokwasów w modelach serów z dodatkowymi bakteriami z rodzaju *Lactococcus* jak i z rodzaju *Lactobacillus* oraz ogrzewanym starterem co wskazuje na praktyczne możliwości intensyfikowania głębokości dojrzewania serów. W produkcji serów daje to możliwość obniżenia kosztów produkcji poprzez skrócenie etapu dojrzewania.

- Modele serów z dodatkowym ogrzewanym starterem XT-312 charakteryzowała niższa ogólna liczba drobnoustrojów, niestarterowych bakterii kwasu mlekowego oraz bakterii z rodzaju *Lactococcus* w porównaniu do kontrolnych co może wskazywać, że dodatkowy ogrzewany starter hamował rozwój nie tylko podstawowego aktywnego startera, ale również NSLAB.

Zastosowanie w produkcji serów dodatkowych szczepów bakterii kwasu mlekowego w połączeniu z wysokiej jakości surowcem i odpowiednimi praktykami produkcyjnymi może zapewnić dobry sposób wytwarzania produktów o zwiększonej zawartości substancji bioaktywnych o prozdrowotnych funkcjach, jak również wpływać na zmniejszenie ryzyka zdrowotnego związanego z występowaniem amin biogennych w serach.

Na podstawie otrzymanych wyników badań można sformułować następujące szczegółowe wnioski dotyczące wpływu zastosowania dodatkowych kultur LAB na występowanie substancji bioaktywnych w serach:

- Zastosowane do wyrobu modeli serów dodatkowe szczepy zarówno z rodzaju *Lactobacillus* jak i *Lactococcus* intensyfikowały tworzenie peptydów o właściwościach przeciwnadciśnieniowych. Zawartość peptydowych inhibitorów ACE wzrastała w czasie dojrzewania modeli serów. Najwyższą aktywność inhibicji ACE stwierdzono w modelach serów z dodatkiem szczepów odpowiednio *Lc. lactis* 11454 i *Lb. delbrüeckii* 490.

- Za przemiany proteolityczne zachodzące w trakcie dojrzewania serów odpowiada zarówno kultura starterowa, jak również dodatkowe szczepy bakterii mlekowych, które intensywnie hydrolizowały kazeinę uwalniając z jej łańcuchów peptydy odpowiedzialne za inhibicję ACE.

- Poddany obróbce cieplnej dodatkowy starter XT-312 może być stosowany w produkcji serów typu holenderskiego w celu poprawy właściwości prozdrowotnych i zintensyfikowania procesów proteolizy w serach. Ogrzewanie dodatkowego startera nawet w temperaturze powyżej 65 °C i w czasie 15 minut skutecznie zwiększało aktywność inhibitorów ACE w badanych modelach serów.

- Zastosowanie nizynotwórczego dodatkowego szczepu *Lc. lactis* 11454 wpływało na zwiększenie zawartości bioaktywnych peptydów i całkowitej zawartości wolnych aminokwasów w modelach serów, jednak aktywności takiej nie wykazano w przypadku drugiego z badanych szczepów nizynotwórczych (*Lc. lactis* 2379) co wskazuje, że właściwości te są szczepo-zależne.

- Zastosowanie dodatkowych szczepów *Lb. rhamnosus* 489 i *Lb. acidophilus* 2499 wpływało na zwiększenie zawartości wolnych aminokwasów (w tym ornityny) i bioaktywnych peptydów (w tym L-karnozyny i anseryny), w porównaniu do pozostałych badanych modeli serów.

- Modele serów otrzymane z dodatkowymi bakteriami z rodzaju *Lactococcus* charakteryzowała niższa zawartość bioaktywnych peptydów (L-karnozyny i anseryny) w porównaniu do modeli serów zawierających dodatkowe bakterie z rodzaju *Lactobacillus*.

- Dodatkowe wybrane szczepy paciorkowców mlekowych z rodzaju *Lactococcus* mogą być wykorzystywane jako kultury pomocnicze w celu obniżania całkowitej zawartości amin biogennych w serach, w tym również zawartości histaminy, uznawanej za jedną najbardziej powszechnych i jednocześnie toksycznych amin biogennych w serach.

Badania z zakresu przebiegu procesu dojrzewania serów obejmujące także aspekty zdrowotne są bardzo trudne, z uwagi na to, że procesy te są wieloczynnikowe, wieloetapowe i niezwykle złożone. Nie mniej jednak z całą pewnością należy je prowadzić, ponieważ biorąc pod uwagę różnorodność surowca, serów, drobnoustrojów stosowanych do ich produkcji jako kultury podstawowe i dodatkowe, stanowią one niewyczerpane źródło innowacyjnych odkryć naukowych.

#### Piśmiennictwo:

1. Addeo F., Chianese L., Salzano A., Sacchi R., Cappuccio U., Ferranti P., Malorni A. Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *J. Dairy Res.* 1992, 59(03), 401-411.
2. Alvarez M.A., Moreno-Arribas M.V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci. Technol.* 2014, 39, 146-155.
3. Aly S., Flouy J., Piot M., Lortal S., Jeanson S. The efficacy of nisin can drastically vary when produced in situ in model cheeses. *Food Microbiol.* 2012, 32, 185-190.
4. Andic S., Genccelep H., Köse S. Determination of biogenic amines in Herby cheese. *Int. J. Food Prop.* 2010, 13, 1300-1314.
5. Ardö Y., Larsson P., Lindmark-Månsson H., Hedenberg A. Studies of peptidolysis during early maturation and its influence on low-fat cheese quality. *Milchwissenschaft* 1989, 44, 485-489.
6. Ardö Y., McSweeney P.L., Magboul A.A., Upadhyay V.K., Fox P.F. Biochemistry of cheese ripening: Proteolysis. In *Cheese*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 445-482.
7. Baptista D.P., Galli B.D., Cavalheiro F.G., Negrão F., Eberlin M.N., Gigante M.L. *Lactobacillus helveticus* LH-B02 favours the release of bioactive peptide during Prato cheese ripening. *Int. Dairy J.* 2018, 87, 75-83.
8. Beganović J., Kos B., Leboš Pavunc A., Uroić K., Džidara P., Šušković J. Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe* 2013, 20, 58-64.
9. Benfeldt C., Sorensen J. Heat treatment of cheese milk: Effect on proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 2001, 11, 567-574.
10. Beresford T., Williams A. The microbiology of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*; Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., Eds.; Academic Press: London, UK, 2004; Volume 1, pp. 287-317.
11. Bergamini C.V., Hynes E.R., Zalazar C.A. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *Int. Dairy J.* 2006, 16, 856-866.
12. Bernabucci U., Catalani E., Basiricò L., Morera P. In vitro ACE-inhibitory activity and in vivo antihypertensive effects of water-soluble extract by Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses. *Int. Dairy J.* 2014, 37, 16-19.
13. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.* 2013, 93, 1803-1845.
14. Broadbent J.R., Barnes M., Brennand C., Strickland M., Houck K., Johnson M.E., Steele J.L. Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 1778-1785.
15. Buňková L., Buňka F., Mantlová G., Cablová A., Sedláce I., Svec P., Pachlová V., Kračmar S. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiol.* 2010, 27, 880-888.
16. Buňková L., Adamcová G., Hudcová K., Velichová H., Pachlová V., Lorencová E., Buňka F. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chem.* 2013, 141, 548-551.
17. Burdychova R., Komprda T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007, 276, 149-155.
18. Burns P., Cuffia F., Milesi M., Vinderola G., Meinardi C., Sabbag N., Hynes E. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. *Food Microbiol.* 2012, 30, 45-50.

19. Chapot-Chartier M.P., Deniel C., Rousseau M., Vassal L., Gripon J.C. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 1994, 4, 51–269.
20. Chen Y.S., Christensen J.E., Strickland M., Steele J.L. Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 1276–1282.
21. Chez M.G., Buchanan C.P., Aimonovitch M.C., Becker M., Schaefer K., Black C., Komen J. Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J. Child Neurol.* 2002, 17, 833–837.
22. Christensen J.E., Steele J.L. Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *J. Bacteriol.* 2003, 185, 3297–3306.
23. Comas-Basté O., Sánchez-Pérez S., Veciana-Nogués M.T., Latorre-Moratalla M., Vidal-Carou M.C. Histamine intolerance: the current state of the art. *Biomolecules* 2020, 10, 1181.
24. Corona C., Frazzini V., Silvestri E., Lattanzio R., La Sorda R., Piantelli M., Canzoniero L.M., Ciavardelli D., Rizzarelli E., Sensi S.L. Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice. *PLoS ONE* 2011, 6, e17971.
25. Crow V., Curry B., Hayes M. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *Int. Dairy J.* 2001, 11, 275–283.
26. Crow V., Coolbear T., Gopal P., Martley F., McKay L., Riepe H. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 1995, 5, 855–875.
27. Cui R., Li B., Suemaru K., Araki H. Psychological stress-induced changes in sleep patterns and their generation mechanism. *Yakuga Zasshi* 2008, 128, 405–411.
28. Cui Y., Miao K., Niyaphorn S., Qu X. Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: a systematic review. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 995.
29. Diana M., Rafecas M., Arco C., Quílez J. Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content. *J. Food Compos. Anal.* 2014, 35, 94–100.
30. Diaz M., del Rio B., Ladero V., Redruello B., Fernández M., Martin M.C., Alvarez M.A. Isolation and typification of histamine-producing *Lactobacillus vaginalis* strains from cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 215, 117–123.
31. Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T., Shah N.P. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, 2007, 87(1), 21–38.
32. Dziuba B., Dziuba M. Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2014, 13, 5–25.
33. EFSA. Evolus and reduce arterial stiffness - Scientific substantiation of a health claim related to *Lactobacillus helveticus* fermented Evolus® low-fat milk products and reduction of arterial stiffness pursuant to article 14 of the regulation (EC) No 1924/2006 - Scientific opinion of the panel on dietetic products, nutrition and allergies; question number EFSA-Q-2008-218. *EFSA J.* 2008, 824, 1–12.
34. EFSA. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA J.* 2011, 9, 1–93.
35. Ekici K., Okut H., Isleyici O., Sancak Y.C., Tuncay R.M. The determination of some microbiological and chemical features in herby cheese. *Foods* 2019, 8, 23.
36. Farkye N., Madkor S., Atkins H. Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in model cheese system. *Int. Dairy J.* 1995, 5, 715–725.
37. Fernández M., Hudson J.A., Korpela R., de los Reyes-Gavilán C.G. Impact on human health of microorganisms present in fermented dairy products: an overview. *Biomed. Res. Int.* 2015, 1–13.
38. Fernández, M.; Linares, D.M.; del Río, B.; Ladero, V.; Álvarez, M.A. HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: Correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *J. Dairy Res.* 2007, 74, 276–282.
39. Fiechter G., Sivec G., Mayer H.K. Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. *J. Chromatogr. B*, 2013, 927, 191–200.
40. Flasarová R., Pachlová V., Buňková L., Menšíková A., Georgová N., Dráb V., Buňka F. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chem.* 2016, 194, 68–75.
41. Fontenele M.A., do SR Bastos M., dos Santos K.M., Bemquerer M.P., do Egito A.S. Peptide profile of Coalho cheese: a contribution for Protected Designation of Origin (PDO). *Food Chem.* 2017, 219, 382–390.
42. Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L. Biochemistry of cheese ripening. In *Fundamentals of Cheese Science*; Springer: New York, NY, USA, 2017; pp. 391–442.

43. Galvez A., Abriouel H., Lucas-Lopez R., ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 120, 51–70.
44. Garabal J.I., Rodriguez-Alonso P., Centeno J.A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). *LWT - Food Sci. Technol.* 2008, 41, 1452–1458.
45. Garde S., Tomillo J., Gaya P., Medina M., Nuñez M. Proteolysis in Hispánico cheese manufactured using a mesophilic starter, a thermophilic starter and bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* adjunct culture. *J. Agr. Food Chem.* 2002, 50, 3479–3485.
46. Genay M., Sadat L., Gagnaire V., Lortal S. prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 3238–3249.
47. Hafeez Z., Cakir-Kiefer C., Roux E., Perrin C., Miclo L., Dary-Mouro A. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Rev. Article Food Res. Int.* 2014, 63(Part A), 71–80.
48. Hajiostamloo B. Bioactive component in milk and dairy product. *Int. Sci. Index Agric. Biosyst. Eng.* 2010, 4, 870–874.
49. Hernández-Galán L., Cardador-Martínez A., Picque D., Spinnler H.E., López-del-Castillo Lozano M., Martín del Campo S.T. Angiotensin converting enzyme inhibitors and antioxidant peptides release during ripening of Mexican Cotija hard cheese. *J. Food Res.* 2016, 5(3), 85–91.
50. Herrero-Fresno A., Martínez N., Sánchez-Llana E., Díaz M., Fernández M., Martín M.C., Ladero V., Alvarez M.A. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 157, 297–304.
51. Hynes E., Ogier J.C., Delacroix-Buchet A. Proteolysis during ripening of miniature washed-curd cheese manufactured with different strains of starter bacteria and a *Lactobacillus plantarum* adjunct culture. *Int. Dairy J.* 2001, 11, 587–597.
52. Iovine B., Iannella M.L., Nocella F., Pricolo M.R., Bevilacqua M.A. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett.* 2012, 315, 122–128.
53. Johnson M.J., Steele J.L. Fermented Dairy Products. In: Food Microbiology; Doyle, M.P., Buchanan, R.L., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2013; pp. 825–839.
54. Joosten H.M.L.J., Stadhouders J. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese: 1: Decarboxylative properties of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* 1987, 41, 247–258.
55. Klein N., Lortal S. Attenuated starters: An efficient means to influence cheese ripening—A review. *Int. Dairy J.* 1999, 9, 751–762.
56. Komprda T., Smělá D., Novická K., Kalhotka L., Šustová K., Pechová P. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chem.* 2007, 102, 129–137.
57. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 2006, 16(9), 945–960.
58. Kurata K., Nagasawa M., Tomonaga S., Aoki M., Morishita K., Denbow D.M., Furuse M. Orally administered L-ornithine elevates brain L-ornithine levels and has an anxiolytic-like effect in mice. *Nutr. Neurosci.* 2011, 14, 243–248.
59. Ladero V., Herrero-Fresno A., Martínez N., del Río B., Linares D.M., Fernández M., Martín M.C., Alvarez M.A. Genome sequence analysis of the biogenic amine-degrading strain *Lactobacillus casei* 5b. *Genome Announc.* 2014, 2, 1–2.
60. Ladero V., Calles-Enríquez M., Fernández M., Álvarez M.A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* 2010, 6, 145–156.
61. Ladero V., Linares D.M., Fernández M., Alvarez M.A. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content. *Food Res. Int.* 2008, 41, 1015–1019.
62. Lane C.N., Fox P.F., Walsh E.M., Folkertsma B., McSweeney P.L.H. Effect of compositional and environmental factors on the growth of indigenous non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Le Lait* 1997, 77, 561–573.
63. Law B.A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology; Fox, P.F., Eds.; Elsevier Applied Science Publication Ltd.: London, UK, 1987; Volume 1, pp. 365–392.
64. Lázaro de la Torre C.A., Conte-Junior C.A. Chapter 6—Detection of biogenic amines: quality and toxicity indicators in food of animal origin. In Food Control and Biosecurity, a Volume in Handbook of Food Bioengineering; Holban, A.M., Grumezescu, A.M., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 225–257.
65. Linares D.M., Cruz Martín M., Ladero V., Alvarez M.A., Fernandez M. Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011, 51, 691–703.
66. Linares D.M., Del Río B., Ladero V., Martínez N., Fernández M., Martín M.C., Álvarez M.A. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Front. Microbiol.* 2012, 180, 1–10.
67. Linares D.M., del Río B., Redruello B., Fernández M., Martín M.C., Ladero V., Alvarez M.A. The use of qPCR-based methods to identify and quantify food spoilage microorganisms. In Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques; Bozaris, I.S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2014; pp. 313–334.

68. Liu M., Bayjanov J.R., Renckens B., Nauta A., Siezen R.J. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC Genomics* 2010, 11(1), 36.
69. Liu L., Li X., Bi W., Zhang L., Ma L., Ren H., Li M. Isomaltooligosaccharide increases the *Lactobacillus rhamnosus* viable count in Cheddar cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 2015, 68, 389–398.
70. Lu Y., Govindasamy-Lucey S., Lucey J.A. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *J. Dairy Sci.* 2016, 99(1), 41–52.
71. Lucarini M. Bioactive peptides in milk: From encrypted sequences to nutraceutical aspects. *Beverages* 2017, 3, 41.
72. Martínez-Cuesta M.C., Requena T., Peláez C. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 70, 79–88.
73. Madrau M.A., Mangia N.P., Murgia M.A., Sanna M.G., Garau G., Leccis L., Caredda M., Deiana P. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *Int. Dairy J.* 2006, 16, 876–885.
74. Mayer H.K., Fiechter G. UHPLC analysis of biogenic amines in different cheese varieties. *Food Control* 2018, 93, 9–16.
75. McSweeney P.L.H., Fox P.F. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Dairy Sci. Technol.* 1997, 77, 41–76.
76. Meira S.M.M., Daroit D.J., Helfer V.E., Corrêa A.P.F., Segalin J., Carro S., Brandelli A. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Res. Int.* 2012, 48(1), 322–329.
77. Meisel H., Goepfert A., Gunther S. ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*, 1997, 52(6), 307–311.
78. Meyer J., Spahn A. Influence of X-prolyl-dipeptidylaminopeptidase of *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* on proteolysis and taste of Swiss Gruyère cheese. *Milchwissenschaft* 1998, 53, 449–453.
79. Meyer J., Bütikofer U., Walther B., Wechsler D., Sieber R. Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. *J. Dairy Sci.* 2009, 92(3), 826–836.
80. Michaelidou A., Katsiari M.C., Kondyli E., Voutsinas L.P., Alichanidis E. Effect of a commercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *Int. Dairy J.* 2003, 13, 179–189.
81. Moret S., Bortolomeazzi R., Feruglio M., Lercker G. Determination of biogenic amines in Italian cheeses. *Sci. Tec. Latt. Casearia* 1992, 43, 187–198.
82. Mori M., Mizuno D., Konoha-Mizuno K., Sadakane Y., Kawahara M. Quantitative analysis of carnosine and anserine in foods by performing high performance liquid chromatography. *Biomed. Res. Trace Elem.* 2015, 26, 147–152.
83. Munir M., Nadeem M., Qureshi T.M., Gamlath C.J., Martin G.J.O., Hemar Y., Ashokkumar M. Effect of sonication, microwaves and high-pressure processing on ACE-inhibitory activity and antioxidant potential of Cheddar cheese during ripening. *Ultrason. Sonochem.* 2020, 67, 105140.
84. Nielsen S.D., Beverly R.L., Qu Y., Dallas D.C. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chem.* 2017, 232, 673–682.
85. Novella-Rodríguez S., Veciana-Nogués M.T., Roig-Sagués A.X., Trujillo-Mesa A.J., Vidal-Carou M.C. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *J. Dairy Res.* 2004, 71, 245–252.
86. Ong L., Henriksson A., Shah N.P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int. Dairy J.* 2006, 16, 446–456.
87. Ong L., Henriksson A., Shah N.P. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Le Lait* 2007, 87(2), 149–165.
88. Ong L., Shah N.P. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT-Food Sci. Technol.* 2008a, 41(9), 1555–1566.
89. Ong L., Shah N.P. Influence of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on proteolysis, organic acid profiles, and ACE-inhibitory activity of Cheddar cheeses ripened at 4, 8, and 12° C. *J. Food Sci.* 2008b, 73(3), M111–M120.
90. O’Sullivan O., O’Callaghan J., Sangrador-Vegas A., McAuliffe O., Slattery L., Kaleta P., Callanan M., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Beresford T. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.* 2009, 9:50, 1–9.
91. Pachlová V., Buňková L., Flasarová R., Salek R.N., Dlabajová A., Butor I., Buňka F. Biogenic amine production by nonstarter strains of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus paracasei* in the model system of Dutch-type cheese. *LWT—Food Sci. Technol.* 2018, 97, 730–735.

92. Pappa E.C., Kandarakis I., Anifantakis E.M., Zerfiridis G.K. Influence of types of milk and culture on the manufacturing practices, composition and sensory characteristics of Teleme cheese during ripening. *Food Control* 2006, 17, 570–581.
93. Perin L.M., Dal Bello B., Belviso S., Zeppa G., Carvalho A.F., Coccolin L., Nero L.A. Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 214, 159–167.
94. Picon A., García-Casado M.A., Nuñez M. Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Int. Dairy J.* 2010a, 20(3), 156–162.
95. Picon A., Gaya P., Fernández-García E., Rivas-Cañedo A., Avila M., Nuñez M. Proteolysis, lipolysis, volatile compounds, texture, and flavor of Hispánico cheese made using frozen Ewe milk curds pressed for different times. *J. Dairy Sci.* 2010b, 93(7), 2896–2905.
96. Piras C., Marincola F.C., Savorani F., Engelsen S.B., Cosentino S., Viale S., Pisano M.B. A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. *Food Chem.* 2013, 141, 2137–2147.
97. Pisanu S., Pagnozzi D., Pes M., Pirisi A., Roggio T., Uzzau S., Addis M.F. Differences in the peptide profile of raw and pasteurised ovine milk cheese and implications for its bioactive potential. *Int. Dairy J.* 2015, 42, 26–33.
98. Poveda J.M., Chicón R., Cabezas L. Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. *Int. Dairy J.* 2015, 47, 94–101.
99. Pripp A.H., Sørensen R., Stepaniak L., Sørhaug T. Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *LWT-Food Sci. Technol.* 2006, 39(6), 677–683.
100. Redruello B., Ladero V., Cuesta I., Álvarez-Buylla J.R., Cruz Martín M., Fernández M., Alvarez M.A. A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chem.* 2013, 139, 1029–1035.
101. Renes E., Ladero V., Tornadijo M.E., Fresno J.M. Production of sheep milk cheese with high  $\gamma$ -aminobutyric acid and ornithine concentration and with reduced biogenic amines level using autochthonous lactic acid bacteria strains. *Food Microbiol.* 2019, 78, 1–10.
102. Renes E., Diezhandino I., Fernández D., Ferrazza R.E., Tornadijo M.E., Fresno J.M. Effect of autochthonous starter cultures on the biogenic amine content of ewe's milk cheese throughout ripening. *Food Microbiol.* 2014, 44, 271–277.
103. Roberts, P.R.; Zaloga, G.P. Cardiovascular effects of carnosine. *Biochem. USA* 2000, 65, 856–861.
104. Romano, A., Ladero V., Alvarez M.A., Lucas P.M. Putrescine production via the ornithine decarboxylation pathway improves the acid stress survival of *Lactobacillus brevis* and is part of a horizontally transferred acid resistance locus. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 175, 14–19.
105. Rossi F., Veneri G. Use of bacteriocinogenic cultures without inhibiting cheese associated nonstarter lactic acid bacteria; a trial with *Lactobacillus plantarum*. *Challenges* 2016, 7, 4.
106. ROZPORZĄDZENIE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY (WE) NR 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności. *Off. J. Eur. Communities* 2008, 50, 18.
107. Ryan M.P., Ross R.P., Hill C. Strategy for manipulation of cheese flora using combinations of lactic in producing and -resistant cultures. *App. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 2699–2704.
108. Ryhänen E.L., Pihlanto-Leppälä A., Pahkala E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.* 2001, 11(4), 441–447.
109. Sadat-Mekmene L., Richoux R., Aubert-Frogerais L., Madec M.N., Corre C., Piot M., Jardin J., Le Feunteun S., Lortal S., Gagnaire V. *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses. *J. Dairy Sci.* 2013, 96, 1455–1470.
110. Sadat-Mekmene L., Genay M., Atlan D., Lortal S., Gagnaire V. Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 146, 1–13.
111. Sadat-Mekmene L., Jardin J., Corre C., Mollé D., Richoux R., Delage M.M., Lortal S., Gagnaire V. Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves break down of the pure  $\alpha$ -s1-casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77, 179–186.
112. Sagun E., Ekici K., Durmaz H. The formation of histamine in Herby cheese during ripening. *J. Food Qual.* 2005, 28, 171–178.
113. Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.* 2000, 83(7), 1434–1440.

114. Sallami L., Kheadr E.E., Fliss I., Vuilleumard J.C. Impact of autolytic, proteolytic, and nisin-producing adjunct cultures on biochemical and textural properties of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 1585–1594.
115. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 71(4), 394–406.
116. Settanni L., Massitti O., Van Sinderen D., Corsetti A. In situ activity of a bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 99, 670–681.
117. Sharma S., Singh R., Rana S. Bioactive peptides: A review. *Int. J. Bioautom.* 2011, 15, 223–250.
118. Sheibani A., Ayyash M.M., Shah N.P., Mishra V.K. The effects of salt reduction on characteristics of hard type cheese made using high proteolytic starter culture. *Int. Food Res. J.* 2015, 22, 2452–2459.
119. Sieber R., Bütikofer U., Egger C., Portmann R., Walther B., Wechsler D. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Sci. Technol.* 2010, 90, 47–73.
120. Smacchi E., Gobetti M. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microb. Tech.* 1998, 22(8), 687–694.
121. Smacchi E., Gobetti M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 2000, 17(2), 129–141.
122. Smit G., Smit B.A., Engels W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29, 591–610.
123. Smukowski M., Wendorff W.L., Ping Y., Rao R.D. Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 364.
124. Spano G., Russo P., Lonvaud-Funel A., Lucas P., Alexandre H., Grandvalet C., Coton E., Coton M., Barnavon L., Bach B. i wsp. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2010, 64, 64–951.
125. Spizzirri U.G., Restuccia D., Curcio M., Parisi O.I., Iemma F., Picci N. Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. *J. Food Compos. Anal.* 2013, 29, 43–51.
126. Sridhar V.R., Hughes J.E., Welker D.L., Broadbent J.R., Steele J.L. Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 3025–3032.
127. Stuknytė M., Cattaneo S., Masotti F., De Noni I. Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following in vitro static gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 2015, 168, 27–33.
128. Sugino T., Shirai T., Kajimoto Y., Kajimoto O. L-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutr. Res.* 2008, 28, 738–743.
129. Szcześniak D., Budzeń S., Kopeć W., Rymaszewska J. Anserine and carnosine supplementation in the elderly: Effects on cognitive functioning and physical capacity. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2014, 59, 485–490.
130. Tellez A., Corredig M., Brovko L.Y., Griffiths M.W. Characterization of immune active peptides obtained from milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Res.* 2010, 18, 1–8.
131. Tillakaratne N.J., Medina-Kauwe L., Gibson K.M. gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in 276 mammalian neural and nonneural tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 1995, 112, 247–263.
132. Tomonaga S., Hayakawa T., Yamane H., Maemura H., Sato M., Takahata Y., Morimatsu F., Furuse M. Oral administration of chicken breast extract increases brain carnosine and anserine concentrations in rats. *Nutr. Neurosci.* 2007, 10, 181–186.
133. Van Hoorde K., Van Leuven I., Dirinck P., Heyndrickx M., Coudijzer K., Vandamme P., Huys G. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 144, 226–235.
134. Wunderlichová L., Buňková L., Koutný M., Jančová P., Buňka F. Formation, degradation, and detoxification of putrescine by foodborne bacteria: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2014, 13, 1012–1030.
135. Zhang X., Hao X.Y., Wang H., Li X., Liu L., Yang W., Zhao M., Wang L., Bora A.F.M. The effects of *Lactobacillus plantarum* combined with inulin on the physicochemical properties and sensory acceptance of low-fat Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 2021, 115, 104947.

## 5. Informacje o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W 2001 r. podjęłam studia na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii SGGW w Warszawie. Moje zainteresowania naukowe skierowane były w stronę zastosowań nowych technologii w przemyśle spożywczym. Pracę magisterską pt. *Studia nad wybranymi cechami fizjologicznymi i biochemicznymi szczepów Bacillus cereus pochodzących z różnych środowisk* zrealizowałam w Zakładzie Biotechnologii Mleka, na Wydziale Nauk o Żywności, SGGW w Warszawie pod kierunkiem dr inż. Anny Berthold-Pluta. W październiku 2007 r. rozpoczęłam studia doktoranckie o specjalności technologia żywności, biotechnologia żywności, chemia żywności, inżynieria żywności i ocena jakości żywności przy Wydziale Nauk o Żywności SGGW w Warszawie. W 2011 r. obroniłam z wyróżnieniem pracę doktorską pt. „*Wpływ warunków obróbki termicznej na aktywność proteolityczną wybranych kultur bakterii mlekowych*”, której promotorem był Pan dr hab. Antoni Pluta, prof. SGGW. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, zostałam zatrudniona w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie (IBPRS) na stanowisku adiunkta, gdzie pracowałam do dnia 28.02.2019 r. i pełniłam funkcję kierownika Międzyzakładowej Grupy Problemowej ds. Mleczarstwa. Prowadziłam badania dotyczące występowania bioaktywnych peptydów o właściwościach przeciwnadciśnieniowych w serach podpuszczkowych dojrzewających jak również aktywności proteolitycznej bakterii mlekowych. Od czerwca 2019 r. zostałam zatrudniona w Zakładzie Technologii Mleka, INoŻ, SGGW. Od początku mojego zatrudnienia do 2021 r. zespołem kierowała dr hab. Małgorzata Ziarno, prof. SGGW, a aktualnie – dr hab. Lidia Stasiak-Róžańska.

Moje zainteresowania naukowe zmieniały się wraz z etapem edukacji, doświadczeniem zawodowym oraz pod wpływem środowiska naukowego, z którym miałam okazję współpracować. Wśród moich doświadczeń naukowo-badawczych można wyróżnić następujące kierunki badawcze:

- występowanie i charakterystyka bakterii z rodzaju *Cronobacter* w żywności (pkt 5.1.),
- aktywność przeciwdrobnoustrojowa substancji pochodzenia roślinnego oraz antybiotyków wobec *Cronobacteri* bakterii kwasu mlekowego odpowiednio (pkt 5.2.),
- występowanie w żywności i charakterystyka wybranych cech fizjologicznych oraz toksyczności *Bacillus cereus* (pkt 5.3.),
- wybrane aspekty technologiczne i jakościowe produkcji serów typu holenderskiego (pkt 5.4.),
- wybrane aspekty bezpieczeństwa mikrobiologicznego i właściwości prozdrowotnych żywności (pkt 5.5.).

### 5.1. Występowanie i charakterystyka bakterii z rodzaju *Cronobacter* w żywności

Moje zainteresowania naukowe w znacznym stopniu dotyczą bakterii z rodzaju *Cronobacter* zaliczanych do ruchliwych, względnie beztlenowych, Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* [Forsythe i wsp. 2014]. Do 2007 r. organizmy te klasyfikowano na podstawie cech fenotypowych jako *Enterobacter sakazakii*. Aktualnie rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. condimenti* i *C. universalis* [Iversen i wsp. 2006, 2007, 2008, Joseph i wsp. 2012]. Bakterie z rodzaju *Cronobacter* kojarzone są głównie z wywoływaniem infekcji u noworodków i niemowląt będących przyczyną zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, bakteremii i martwiczego zapalenia jelit [Bowen i Braden 2006, van Acker i wsp. 2001]. *Cronobacter* wykazują szereg cech, które ułatwiają tym mikroorganizmom przeżycie w różnych produktach



spożywczych oraz znaczną zdolność adaptacji do zmiennych warunków, panujących w czasie jej otrzymywania. Dlatego też podjęłam badania mające na celu określenie występowania bakterii z rodzaju *Cronobacter* w żywności pochodzenia zwierzęcego na przykładzie produktów przeznaczonych do żywienia niemowląt i małych dzieci oraz żywności pochodzenia roślinnego, takich jak zioła i przyprawy, produkty niskoprzetworzone typu ready-to-eat (sałaty, kiełki oraz niepasteryzowane soki owocowe i owocowo-warzywne), orzechy oraz suszone i kandyzowane owoce. Dodatkowo u wyizolowanych szczepów *Cronobacter* określono podstawowe cechy fenotypowe i genetyczne. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowałam w pięciu manuskryptach (publikacje II4B5, II4A3, II4A5, II4B12, II4A17).

Występowanie *Cronobacter* spp. w żywności dla niemowląt i małych dzieci oraz w mleku w proszku było szeroko opisywane w piśmiennictwie światowym [Chap i wsp. 2009, Iversen i Forsythe 2004, Jaradat i wsp. 2009, Kandhai i wsp. 2010], natomiast brak był danych z tego zakresu w piśmiennictwie krajowym, dlatego wraz ze współpracownikami podjęłam się badań, których celem było określenie występowania bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz z gatunku *Enterobacter sakazakii* (aktualnie z rodzaju *Cronobacter*) w próbkach handlowych preparatów do żywienia niemowląt w wieku od 0 do 4. miesiąca życia, preparatów przeznaczonych dla niemowląt od 4. do 12. miesiąca życia i produktach dla dzieci w wieku od 9-12 miesiąca do 3 lat (publikacja II4B5). Obecność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w 10 g produktu stwierdzono w 4 próbkach (7%), z czego 3 próbki stanowiły preparaty przeznaczone dla dzieci najstarszych a 1 preparat dla niemowląt od 4. do 12. miesiąca życia. W żadnej z badanych próbek preparatów nie stwierdzono obecności *E. sakazakii* (obecnie *Cronobacter* spp.).

Kolejne podjęte badania miały na celu określenie występowania *Cronobacter* spp. w handlowych przyprawach i ziołach (publikacja II4A3). Wyboru tego rodzaju produktów dokonano na podstawie danych literaturowych, z których wynika, że bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, obok bakterii przetrwalnikujących oraz pleśni, stanowią najliczniejszą grupę drobnoustrojów przypraw i ziół [Banerjee i Sarkar 2004, Garcia i wsp. 2001, Witkowska i wsp. 2011]. Obecność bakterii z rodzaju *Cronobacter* stwierdzono w 10 próbkach (17%), z czego 9 próbek stanowiły zioła (bazylia, estragon, liście pietruszki) i jedna mieszanka przypraw (zioła prowansalskie). Z danych piśmiennictwa, wynika, że roślinne produkty suszone, do których należą przyprawy i zioła charakteryzują się dużą częstotliwością występowania bakterii z rodzaju *Cronobacter* w zakresie od około 3 do 52% [Baumgartner i wsp. 2009, Brandão i wsp. 2017, Hochel i wsp. 2012, Iversen i Forsythe 2007, Jaradat i wsp. 2009, Kandhai i wsp. 2010, Li i wsp. 2014, Ogihara i wsp. 2014, Restiano i wsp. 2006, Singh i wsp. 2015, Sospedra i wsp. 2010, Turcovský i wsp. 2011]. Większość badanych próbek przypraw i ziół charakteryzowała się dobrą jakością mikrobiologiczną - w 60% próbek OLD nie przekraczała 4 log jtk/g a w żadnej z próbek nie stwierdzono >6 log jtk/g.

Kolejnym, podjętym kierunkiem badawczym, który wynikał z interpretacji wyników otrzymanych w publikacji II4A3 oraz analizy danych piśmiennictwa (publikacja II4B12) było określenie występowania bakterii z rodzaju *Cronobacter* w produktach roślinnych, takich jak kiełki, sałaty i niepasteryzowane soki owocowe i owocowo-warzywne (publikacja II4A5). Izolaty *Cronobacter* na podstawie analizy PCR-RFLP oraz analizy RAPD-PCR zostały przypisane do określonego gatunku z rodzaju *Cronobacter*. Dodatkowo, określono także wrażliwość wyizolowanych szczepów *Cronobacter* spp. na wybrane antybiotyki. Materiałem badawczym było 60 próbek produktów zaliczanych do grupy RTE, czyli ready-to-eat, a więc takich, które nie wymagają żadnej obróbki przed spożyciem, w tym warzywa liściaste i ich mieszanki (tzw. sałaty), kiełki oraz niepasteryzowane soki owocowe i owocowo-warzywne. Wszystkie sałaty i kiełki oznakowane były przez producentów jako "umyte - gotowe do spożycia". Na podstawie analizy filogenetycznej danych sekwencji stwierdzono, że 14 z 21 izolatów wykazywało podobieństwo do szczepów referencyjnych *C. sakazakii* NCTC 8155 i *C. malonicus* LMG 23826 i ich zidentyfikowanie na poziomie gatunkowym na podstawie analizy

sekwencji genów 16S rDNA nie było możliwe. Cztery izolaty (s16, s34, s50 i s51) zidentyfikowano jako *C. muytjensii*, dwa kolejne izolaty (lv53 i lv54) - jako *C. turicensis* i jeden jako *C. condimenti* (szczep s37). Podsumowując, na podstawie fenotypu oraz analizy genotypowej wyizolowanych szczepów, obecność *Cronobacter* spp. potwierdzono w 35% badanych próbek, w tym 30% próbek sałat (rukoli, roszonek, endywii i mieszankach sałat) i 75% próbek kiełków (lucerny, brokuła, soczewicy, rzodkiewki, słonecznika, pora i mieszanki kiełków) i są to dane znajdujące potwierdzenie w literaturze [Althaus i wsp. 2012, Baumgartner i wsp. 2009, Hochel i wsp. 2012, Kim i wsp. 2011, Vojkovska i wsp. 2016].

W trakcie badań przedstawionych w publikacji I14A5 wyizolowaliśmy szczep *C. condimenti* s37, który okazał się drugim na świecie wyizolowanym szczepem z tego gatunku (pierwszy szczep *C. condimenti* LMG26250T wyizolowali i opisali Joseph i wsp. [2012]) co potwierdził prof. Stephen Forsythe ze School of Science and Technology, Nottingham Trent University w Wielkiej Brytanii, z którym nawiązałyśmy współpracę. Dzięki współpracy z Prof. S. Forsythe'em a także z dr hab. Tamarą Aleksandrak-Piekarczyk z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, szczep umieszczono w bazie *Cronobacter*PubMLST pod numerem ID 1896, a następnie w DDBJ/ENA/GenBank pod numerem akcesyjnym RQEO01000001-RQEO01000043.

Kolejnym krokiem było określenie występowania bakterii z rodzaju *Cronobacter* w produktach takich jak orzechy, nasiona i suszone owoce (publikacja I14A17). Analizie poddano 64 próbki orzechów handlowych, suszonych lub kandyzowanych owoców, nasion oraz mieszanek nasion, suszonych owoców i orzechów. Obecność *Cronobacter* stwierdzono w 12 (19%) próbkach: orzechów (10 próbek) i mieszanek (2 próbki). Spośród 12 wyizolowanych szczepów *Cronobacter* 3 szczepy należały do gatunku *C. sakazakii*, 5 - do *C. malonaticus* i 4 - do *C. turicensis*. Obecność *C. sakazakii*, stwierdzono w 10% próbek orzechów (orzechy brazylijskie) i 12% mieszanek, *C. turicensis* - w 20% próbek orzechów (orzechy laskowe i migdały) i *C. malonaticus* - w 20% orzechów (orzechy laskowe, nerkowca, macadamia i pini) oraz 12% mieszanek. Otrzymane przez nas wyniki potwierdziły obecność gatunku *Cronobacter* spp. w produktach pochodzenia roślinnego przeznaczonych do bezpośredniego spożycia.

W ramach kontynuacji niniejszego zagadnienia złożyłam projekt Miniatura 3 zatytułowany „Charakterystyka *Cronobacter* spp. o istotnym znaczeniu klinicznym wyizolowanych z produktów spożywczych” [DEC-2019/03/X/NZ901583], do Narodowego Centrum Nauki, który uzyskałam i zrealizowałam. Genetyczne podłoże zjadliwości szczepów *Cronobacter* spp. nie zostało dotychczas dokładnie poznane, stwierdzono jednak, że niektóre genotypy (typy sekwencyjne, ST) powiązane są z określonymi zakażeniami [Forsythe i wsp. 2014]. Zakażenia u dzieci i dorosłych wywoływane były głównie przez kompleksy klonalne *C. sakazakii* CC4 i *C. malonaticus* CC7 [Forsythe i wsp. 2014]. Zapalenie opon mózgowych u niemowląt najczęściej powodowane było przez szczepy *C. sakazakii* należące do kompleksu klonalnego CC4 (w tym dominującego ST4), podczas gdy *C. sakazakii* ST12 był powiązany z przypadkami martwiczego zapalenia jelit u niemowląt. Analiza MLST (Multi-locus Sequence Typing) jest metodą genetyczną zalecaną w celu charakteryzowania, różnicowania i typowania wielu drobnoustrojów. Metoda typowania MLST nieprzypadkowo stała się obiektem zainteresowania. Charakteryzuje drobnoustroje pod kątem alleli w siedmiu locus obejmujących: gen kodujący syntetazę glutaminylo tRNA (*glnS*), gen kodujący dużą podjednostkę syntazy glutaminianu (*gltB*), łańcuch beta syntazy ATP (*atpD*), podjednostkę beta gyrazy DNA (*gyrB*), syntazę fosfoenolopirogronianu A (*ppsA*), gen kodujący czynnik inicjacji translacji IF-2 (*infB*) oraz gen kodujący białko translokazy i czynnika elongacyjnego EF-G (*fusA*). Analiza ta dostarcza informacji, ułatwiających rozpoznanie typów sekwencyjnych (ST) i kompleksów klonalnych (CC) badanych szczepów *Cronobacter*, a tym samym ich zróżnicowanie genetyczne. Występowanie różnych hemolizyn i genów związanych z hemolizą była stwierdzana u *Cronobacter* spp. [Joseph i wsp. 2012]. W związku z powyższym

istotne i uzasadnione było podjęcie badań mających na celu poznanie typów sekwencyjnych wyizolowanych z rynkowych sałat, kiełków, orzechów i owoców suszonych szczepów *Cronobacter* spp., które zrealizowano w ramach projektu Miniatura 3. Wyniki tych badań omówiono w publikacji przesłanej w maju 2022 r. do redakcji czasopisma Food Microbiology.

Piśmiennictwo:

1. Althaus D., Hofer E., Corti S., Julmi A., Stephan R. Bacteriological survey of ready-to-eat lettuce, fresh-cut fruit, and sprouts collected from the Swiss market. *J. Food Protect.* 2012, 75, 1338-1341.
2. Banerjee M., Sarkar P.K. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. *Food Control* 2004, 15, 491-496.
3. Baumgartner A., Grand M., Liniger M., Iversen C. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 136, 89-192.
4. Bowen A.B., Braden C.R. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 1185-1189.
5. Brandão M.L.L., Umeda N.S., Jackson E., Forsythe S.J., de Filippis I. Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. *Food Microbiol.* 2017, 63, 129-138.
6. Chap J., Jackson P., Siqueira R., Gaspar N., Quintas C., Park J., Osaili T., Shaker R., Jaradat Z., Hartantyo S.H.P., Andullah Sani N., Estuningsih S., Forsythe S.J. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 136, 185-188.
7. Forsythe S.J., Dickins B., Jolley K.A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. *BMC Genomics* 2014, 15, 1121.
8. Garcia S., Iracheta F., Galván F., Heredia N. Microbiological survey of retail herbs and spices from Mexican markets. *J. Food Protect.* 2001, 64, 99-103.
9. Hochel I., Růžičková H., Krásný L., Demnerová K. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. *J. Appl. Microbiol.* 2012, 112, 1257-1265.
10. Iversen C., Forsythe S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *J. Food Microbiol.* 2004, 21, 771-777.
11. Iversen C., Waddington M., Farmer J.J., Forsythe S.J. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. *BMC Microbiol.* 2006, 6, 94.
12. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I. i wsp. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter mytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evol. Biol.* 2007, 7, 64.
13. Iversen C., Forsythe S. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73(1), 48-52.
14. Iversen C., Mullane N., McCardell B., Tall B.D., Lehner A., Fanning S. i wsp. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter mytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 2008, 58, 1442-1447.
15. Jaradat Z., Ababneh Q., Saadoun I., Samara N., Rashdan A. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiol.* 2009, 9, 225-235.
16. Joseph S., Cetinkaya E., Drahovska H., Levican A., Figueras M.J., Forsythe S.J. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water, and food ingredients. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 2012, 62, 1277-1283.
17. Joseph S., Desai P., Ji Y., Cummings C.A., Shih R., Degoricija L., Rico A., Brzoska P., Hamby S.E., Masood N., Hariri S., Sonbol H., Chuzhanova N., McClelland M., Furtado M.R., Forsythe S.J. Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species. *PLoS ONE* 2012, 7, 49455.
18. Kandhai M.C., Heuvelink A.E., Reij M.W., Beumer R.R., Dijk R., van Tilburg J.J.H., van Schothorst M., Gorris L.G.M. A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in The Netherlands between 2001 and 2005. *Food Control* 2010, 21, 1127-1136.
19. Kim J.B., Park Y.B., Kang S.H., Lee M.J., Kim K.Ch. i wsp. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from sunshik, its ingredients and soils. *Food Sci. Biotechnol.* 2011, 20, 941-948.
20. Li Y., Chen Q., Zhao J., Jiang H., Lu F., Bie X., Lu Z. Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control* 2014, 37, 109-114.
21. Ogihara H., Kiribe N., Fukuda N., Furukawa S., Morinaga Y., Igimi S. *Cronobacter* spp. in commercially available dried food in Japan. *Biocontrol Sci.* 2014, 19, 209-213.

22. Restiano L., Frampton E.W., Lionberg W.C., Becker R.J. A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from food, food ingredients, and environmental sources. *J. Food Protect.* 2006, 69, 315-322.
23. Singh N., Goel G., Raghav M. Prevalence and characterization of *Cronobacter* spp. from various foods, medicinal plants, and environmental samples. *Curr. Microbiol.* 2015, 71, 31-38.
24. Sospedra I., Soriano J., Manes J. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs commercialized in Spain. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2010, 65, 364-368.
25. Turcovský I., Kuniková K., Drahovská H., Kačlíková E. Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011, 99, 257-269.
26. Van Acker J., De Smet F., Muyldermans G., Bougateg A., Naessens A., Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39(1), 293-297.
27. Vojkowska H., Karpiskova R., Orieskova M., Drahovska H. Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected from farms and from supermarkets in the Czech Republic. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 217, 130-136.
28. Witkowska A., Hickey D., Alonso-Gomez M., Wilkinson M. The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control* 2011, 22, 616-625.

## 5.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa substancji pochodzenia roślinnego oraz antybiotyków wobec *Cronobacter* i bakterii kwasu mlekowego odpowiednio

Aktywność przeciwbakteryjna różnych olejków eterycznych oraz substancji czystych wchodzących w ich skład, wobec różnych patogenów była tematem wielu publikacji [Kim i Rhee 2016, Mattson i wsp. 2011, Ojeda-Sana i wsp. 2013, Tajkarimi i wsp. 2010, Thippeswamy i wsp. 2013]. Badania z tego zakresu w odniesieniu do bakterii z rodzaju *Cronobacter* są nieliczne i dotyczą głównie *C. sakazakii* [Al-Nabulsi i wsp. 2015, Amalaradjou i wsp. 2009, Fraňková i wsp. 2014, Lee i Jin 2008]. Wiedza na temat wrażliwości innych gatunków *Cronobacter* spp. na olejki eteryczne i substancje aktywne pochodzenia roślinnego jest jeszcze bardziej uboga. Dlatego też podjęto badania mające na celu określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej 18 wybranych olejków eterycznych wobec 21 szczepów z 5 gatunków bakterii z rodzaju *Cronobacter*, a także określenie wrażliwości pięciu szczepów z gatunków *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. turicensis* oraz *C. condimenti* na substancje aktywne takie jak: tymol, aldehyd cynamonowy, eugenol i mentol, wchodzące w skład olejku tymiankowego, cynamonowego, goździkowego oraz olejku z mięty pieprzowej, odpowiednio (publikacja I14A6). Materiał badawczy stanowiły szczepy *Cronobacter* wyizolowane z rynkowych sałat i kiełków (publikacja I14A5). Największe strefy zahamowania wzrostu szczepów bakterii z rodzaju *Cronobacter* spp. zaobserwowano w przypadku olejku tymiankowego, który okazał się silnie hamujący dla 13 szczepów, a najbardziej wrażliwe okazały się szczepy *C. muytjensii*. Bardziej odporne na działanie tego olejku były szczepy z gatunków *C. turicensis*, *C. malonaticus* i *C. condimenti*. Głównymi składnikami olejku tymiankowego, o których działaniu wiadomo też najwięcej, są tymol i karwakrol [Santurio i wsp. 2014, Soković i wsp. 2010]. Badane szczepy wykazywały tolerancję na tymol w zakresie stężeń od 0,013 do 0,025% (maksymalne stężenie tolerowane - MTC), natomiast minimalne stężenie hamujące (MIC) tymolu dla wszystkich szczepów wynosiło 0,05%. Hamujące działanie tymolu wobec szczepów *Cronobacter* spp. wykazali Lee i Jin [2008] i Fraňková i wsp. [2014].

Wrażliwość na olejek cynamonowy stwierdzono tylko u trzech szczepów: *C. muytjensii* s51, *C. sakazakii* s41 i *C. turicensis* lv54, a wobec wszystkich pozostałych szczepów olejek ten wykazywał umiarkowaną aktywność. Silne właściwości hamujące olejku cynamonowego wobec *C. sakazakii* stwierdzili Al-Nabulsi i wsp. [2015]. Głównym składnikiem olejku cynamonowego jest m.in. aldehyd *trans*-cynamonowy w przypadku, którego określono porównywalną z tymolem aktywność przeciwdrobnoustrojową. Aldehyd cynamonowy zmniejsza oporność *C. sakazakii* na stres osmotyczny, wysuszenie oraz ogranicza ruchliwość i zdolność tworzenia biofilmu [Amalaradjou i Venkitanarayanan 2011a, 2011b].

Olejek goździkowy okazał się nieskuteczny do zahamowania wzrostu 9 spośród 21 badanych szczepów. Dane dotyczące właściwości przeciwdrobnoustrojowych olejku goździkowego wobec *Cronobacter* spp. są ograniczone jedynie do informacji o MIC olejku goździkowego dla *C. sakazakii* i *C. malonaticus*, który wynosił 0,05% [Fraňková i wsp. 2014]. Jak podaje Singh i wsp. [2016] ekstrakt goździkowy hamował tworzenie biofilmów przez *C. sakazakii*. Podstawowym składnikiem olejku goździkowego jest eugenol [Devi i wsp. 2010, Hu i wsp. 2018]. W naszych badaniach szczepy *Cronobacter* tolerowały obecność eugenolu na poziomie od 0,05 do 0,1% (MTC), a najmniejszą wrażliwością charakteryzował się szczep *C. condimentis*37.

Żaden z przebadanych szczepów *Cronobacter* nie był wrażliwy na olejek z mięty pieprzowej. Na umiarkowane właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku z mięty pieprzowej wskazują dane piśmiennictwa zarówno w odniesieniu do bakterii Gram(+) jak i Gram(-) [Eteghad i wsp. 2009, Jeyakumar i wsp. 2011, Rusenova i Parvanov 2009, Soković i wsp. 2010, Tyagi i Malik 2011]. W naszych badaniach mentol charakteryzował się najslabszym działaniem przeciwdrobnoustrojowym wobec szczepów *Cronobacter* w porównaniu do pozostałych trzech badanych czystych składników olejków eterycznych. MIC mentolu dla czterech spośród badanych szczepów wynosiło 0,8%, a tylko szczep *C. turicensis* lv53 wykazał większą wrażliwość (MIC = 0,4%). Z kolei, wartość MTC mentolu dla badanych szczepów mieściła się w przedziale od 0,2 do 0,4%. Nie znaleziono w piśmiennictwie wyników badań z zakresu przeciwdrobnoustrojowych właściwości mentolu oraz olejku z mięty pieprzowej wobec *Cronobacter* spp.

Zdecydowana większość badanych szczepów *Cronobacter* wykazywała umiarkowaną wrażliwość na olejek majerankowy i kminkowy, a żaden z nich nie był wrażliwy (strefa zahamowania wzrostu < 12 mm) na olejki: rozmarynowy, bazyliowy, kardamonowy, anyżowy i imbirowy oraz wszystkie olejki z roślin cytrusowych (limetkowy, bergamotkowy, pomarańczowy, cytrynowy, grapefruitowy i mandarynkowy). Dane piśmiennictwa z zakresu aktywności przeciwdrobnoustrojowej tych olejków lub ich składników wobec bakterii z rodzaju *Cronobacter* są skąpe. Al-Nabulsi i wsp. [2015] wykazali brak aktywności olejku anyżowego i rozmarynowego przeciwko szczepom *C. sakazakii*. Fraňková i wsp. [2014] wyznaczyli MIC dla substancji wchodzących w skład różnych olejków cytrusowych wobec *C. sakazakii* i *C. malonaticus*. Z kolei Shi i wsp. [2016] wykazali, że cytral, składnik olejków cytrusowych, hamował wzrost *C. sakazakii*.

Otrzymane wyniki skłoniły nas do podjęcia kolejnych badań dotyczących określenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej celulozy bakteryjnej wytwarzanej przez *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 lub *Komagataeibacter* sp. GH1 nasączonej olejkiem eterycznym z oregano względem wybranych szczepów z rodzaju *Cronobacter* wyizolowanych z produktów roślinnych. Celem tych badań było sprawdzenie czy celuloza bakteryjna nasączona olejkiem z oregano może w przyszłości stanowić materiał do produkcji opakowań do żywności, który ograniczałby rozwój *Cronobacter* w produktach spożywczych (publikacja I14A13). Bioceluloza, nazywana „biomateriałem przyszłości”, to naturalny i przyjazny dla środowiska polimer, wytwarzany m.in. przez wyselekcjonowane szczepy bakterii octowych [Kamarudin i wsp. 2018, Kasim i Rahman 2016]. Bioceluloza nasączona naturalnymi substancjami przeciwdrobnoustrojowymi może być stosowana jako nowatorski, bezpieczny i biodegradowalny materiał opakowaniowy do żywności, pomagając wydłużyć okres przydatności do spożycia produktów, a także mogący zastąpić typowe opakowania z tworzyw sztucznych, co w dzisiejszych czasach stanowi duży problem środowiskowy. Wykazano, że olejek oreganowy wnika w strukturę celulozy bakteryjnej, a po nałożeniu celulozy na podłoże stałe wykazuje zdolność migracji. Biopolimer wytwarzany przez szczep *K. sp.* GH1 był w stanie lepiej wchłaniać i zatrzymywać olejek z oregano w porównaniu z celulozą bakteryjną wytwarzaną przez *G. hansenii* ATCC 23769. Celuloza bakteryjna wytwarzana przez *Komagataeibacter* GH1 nasączona olejkiem oreganowym wykazywała ogólnie lepsze właściwości hamujące wzrost badanych szczepów *Cronobacter* niż jej odpowiednik uzyskany z *G. hansenii*.

Było to prawdopodobnie spowodowane układem włókien polimerowych celulozy i jej ostateczną grubością. Największą strefę zahamowania wzrostu zaobserwowano względem *C. condimenti* s37 (32,75 mm) oraz *C. malonicus* lv31 (28,33 mm). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że celuloza bakteryjna nasączona olejkim oreganowym wykazywała silne lub umiarkowane działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec wszystkich badanych szczepów z rodzaju *Cronobacter*. Uzyskane wyniki skłaniają do dalszych badań określających możliwość wykorzystania tego biopolimeru do produkcji ekologicznych opakowań do żywności, które wraz z zespołem aktualnie kontynuujemy.

Rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki jest poważnym problemem zdrowotnym na całym świecie ze względu na rosnący wskaźnik izolacji patogenów opornych na wiele leków utrudniający leczenie infekcji. Łańcuch pokarmowy uznano za jedną z kluczowych dróg przenoszenia bakterii opornych na antybiotyki między zwierzętami a ludźmi. Biorąc pod uwagę, że LAB mogą działać jako rezerwuar przenoszonych genów oporności na antybiotyki, należy monitorować szczepy LAB przeznaczone do stosowania jako dodatki paszowe pod kątem ich bezpieczeństwa [Devirgiliis i wsp. 2011, EFSA 2018, Plumed-Ferrer i wsp. 2015]. Sześćdziesiąt pięć szczepów LAB (57 szczepów *Lactobacillus*, 6 *Pediococcus*, 2 *Enterococcus*), które mogą być potencjalnie stosowane jako probiotyczne dodatki do pasz lub inokulanty do kiszonek, oceniono pod kątem wrażliwości na 8 klinicznie istotnych środków przeciwdrobnoustrojowych poprzez określenie MIC (publikacja II4A16). Wśród szczepów opornych na środki przeciwdrobnoustrojowe zbadano także występowanie wybranych genów związanych z opornością nabytą. Dziewiętnaście szczepów LAB wykazywało oporność fenotypową na jeden antybiotyk, a 15 szczepów było opornych na więcej niż jeden z badanych antybiotyków. Zaobserwowano wysoką wrażliwość szczepów LAB na ampicylinę (98% szczepów) i chloramfenikol (97% szczepów), co jest zgodne z szeregiem danych literaturowych [Anisimova i wsp. 2019, Danielsen i wsp. 2003, Dec i wsp. 2017, 2020]. Oporność na aminoglikozydy i tetracykliny była najbardziej rozpowszechniona i stwierdzona u odpowiednio 37 i 26% badanych szczepów LAB. W przypadku pojedynczych szczepów stwierdzono także fenotypową oporność na te substancje przeciwdrobnoustrojowe. Determinanty związane z fenotypami oporności wykryto u 15 szczepów: gen *aph(3'')-IIIa* – u 9 szczepów, gen *lnu(A)* – u 3 szczepów, geny *str(A)-str(B)*, *erm(B)*, *msr(C)* i *tet(M)* – u 2 szczepów oraz gen *tet(K)* u 1 szczepu. Sekwencje nukleotydowe wykrytych genów wykazały homologię z sekwencjami genów oporności występującymi zarówno u LAB, jak i u różnych patogenów. Otrzymane wyniki badań wskazują, że LAB mogą stanowić rezerwuar determinant oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, dlatego pierwszym i kluczowym krokiem w rozważaniu przydatności szczepów LAB jako dodatków paszowych powinna być ocena ich oporności na antybiotyki. To kryterium bezpieczeństwa powinno zawsze poprzedzać bardziej złożone badania, takie jak ocena zdolności adaptacyjnych szczepu lub jego korzystnego wpływu na żywiciela.

#### Piśmiennictwo:

1. Al-Nabulsi A.A., Awaisheh S.S., Osaili T.M., Olaimat A.N., Rahahaleh R.J., Al-Dabbas F.M., Al-Kharabsheh L.A., Gyawali R., Ibrahim S.A. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted infant milk formula by plant essential oils. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2015, 88(1), 97-101.
2. Amalaradjou M.A., Hoagland T.A., Venkitanarayanan K. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 129(2), 146-149.
3. Amalaradjou M.A., Venkitanarayanan K. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. *J. Food Protect.* 2011a, 74, 200-208.
4. Amalaradjou M.A., Venkitanarayanan K. Effect of trans-cinnamaldehyde on reducing resistance to environmental stresses in *Cronobacter sakazakii*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2011b, 8, 403-409.
5. Anisimova E.A., Yarullina D.R. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol.* 2019, 76, 1407-16.
6. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* ssp. To antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 83, 1-11.
7. Dec M., Stepień-Pyśniak D., Nowaczek A., Puchalski A., Urban-Chmiel R. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profiles of fecal lactobacilli from domesticated pigeons in Poland. *Anaerobe* 2020, 65, 102251.

8. Dec M., Urban-Chmiel R., Stepień-Pyśniak D., Wernicki A. Assessment of antibiotic susceptibility in *Lactobacillus* isolates from chickens. *Gut Pathog.* 2017, 9, 54.
9. Devi K.P., Nisha S.A., Sakthivel R., Pandian S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella* Typhi by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 130, 107-115.
10. Devirgiliis C., Barile S., Perozzi G. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes Nutr.* 2011, 6, 275-284.
11. EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or production organisms. *EFSA J.* 2018, 6, 5206.
12. Eteghad S.S., Mirzaei M., Pour S.F., Kahnemui S. Inhibitory Effects of endemic *Thymus vulgaris* and *Mentha piperita* essential oils on *Escherichia coli* O157:H7. *Res. J. Biological Sci.* 2009, 4(3), 340-344.
13. Fraňková A., Marounek M., Mozrová V., Weber J., Klouček P., Lukešová D. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2014, 11(10), 795-797.
14. Hu Q., Zhou M., Wei S. Progress on the antimicrobial activity research of clove oil and eugenol in the food antiseptics field. *J. Food Sci.* 2018, 83, 1476-1480.
15. Jeyakumar E., Lawrence R., Pal T. Comparative evaluation in the efficacy of peppermint (*Mentha piperita*) oil with standard antibiotics against selected bacterial pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2011, S253-S257.
16. Kamarudin N.S.B., Rahman N.A., Kalil S.M., Kamarudin S.K. Comparative study of biocellulose from *Acetobacter xylinum* 0416 and commercial hard gelatine capsule. *Int. J. Appl. Eng. Res.* 2018, 13, 743-748.
17. Kasim N., Rahman N.A. Design and production control of biocellulose from *Acetobacter xylinum*. *Indian J. Sci. Technol.* 2016, 9, 1-10.
18. Kim S.A., Rhee M.S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, *b*-resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control* 2016, 60, 447-454.
19. Lee S.Y., Jin H.H. Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008, 47(4), 315-321.
20. Mattson T.E., Johny A.K., Amalaradjou M.A.R., More K., Schreiber D.T. i wsp. Inactivation of *Salmonella* spp. on tomatoes by plant molecules. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 144, 464-468.
21. Ojeda-Sana A.M., van Baren C.M., Elechosa M.A., Juárez M.A., Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* 2013, 31, 189-195.
22. Plumed-Ferrer C., Barberio A., Franklin-Guild R., Werner B., McDonough P., Bennett J. i wsp. Antimicrobial susceptibilities and random amplified polymorphic DNA-PCR fingerprint characterization of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactococcus garvieae* isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 2015, 98, 6216-25.
23. Rusenova N., Parvanov P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia J. Sci.* 2009, 7(1), 37-43.
24. Santurio D.F., Kunz de Jesus F.P., Zanette R.A., Schlemmer K.B., Fraton A., Martins Fries L.L. Antimicrobial activity of the essential oil of thyme and of thymol against *Escherichia coli* strains. *Acta Sci. Vet.* 2014, 42, 1234.
25. Shi C., Song K., Zhang X., Sun Y., Sui Y., Chen Y., Jia Z., Sun H., Sun Z., Xia X. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS ONE* 2016, 11(7).
26. Singh N., Patil A., Prabhune A., Goel G. Inhibition of quorum-sensing-mediated biofilm formation in *Cronobacter sakazakii* strains. *Microbiology* 2016, 162, 1708-1714.
27. Soković M., Glamoclija J., Marin P.D., Brikić D., Van Griensven L.J.L.D. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules* 2010, 15(11), 7532-7546.
28. Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 2010, 21, 1199-1218.
29. Thippeswamy N.B., Naidu K.A., Achur R.N. Antioxidant and antibacterial properties of phenolic extract from *Carum carvi* L. *Journal of Pharmacy Research* 2013, 7, 352-357.
30. Tyagi A.K., Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control* 2011, 22, 1707-1714.

### 5.3. Występowanie w żywności i charakterystyka wybranych cech fizjologicznych oraz toksyczności *Bacillus cereus*

Część badań poświęciłam charakterystyce cech fizjologicznych i toksyczności szczepów *B. cereus*. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowałam w ramach 3 publikacji (I14A2, I14A8 i I14B2).

*Bacillus cereus* to bakterie Gram(+) tworzące przetrwalniki i powszechnie spotykane w środowisku. Bakterie te są również częstym zanieczyszczeniem surowej lub przetworzonej żywności pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego [Choma i wsp. 2000, Sarrias i wsp. 2002, Torre Del i wsp. 2001]. *B. cereus*

stanowią składnik mikroflory gleby, który może adaptować się i namnażać w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego (GIT) [Barbosa i wsp. 2005]. Są także patogenami oportunistycznymi odpowiedzialnymi za zakażenia miejscowe i ogólnoustrojowe [Stenfors Arnesen i wsp. 2008]. Patogenność *B. cereus* przypisuje się wytwarzaniu przez ten gatunek czynników pozakomórkowych, takich jak fosfolipaza, cereulidyna (toksyna wymiotna), enterotoksyna Hbl, toksyna niehemolityczna (Nhe), hemolizyna IV, która ma silne działanie niszczące błony komórkowe i cytotoksyna martwiczego zapalenia jelit (CytK) [Agata i wsp. 1995, Beecher i wsp. 1995, 2000, Hardy i wsp. 2001, Lund i wsp. 2000]. *B. cereus* może powodować dwa rodzaje zatruc pokarmowych: zatrucie wymiotne i biegunkowe. Pierwsze z nich spowodowane jest spożyciem pokarmu zawierającego cereulidynę, natomiast biegunkowy typ zatrucia pokarmowego wywołany jest spożyciem zanieczyszczonego przez *B. cereus* pokarmu i wytworzeniem toksyn w przewodzie pokarmowym. Szacowana dawka zakaźna wymagana do wywołania biegunkowego typu zatrucia pokarmowego wynosi od  $10^5$  do  $10^8$  komórek wegetatywnych lub przetrwalników *B. cereus* [EFSA 2005]. Wśród czynników, które w największym stopniu hamują przeżycie *B. cereus* w przewodzie pokarmowym człowieka wyróżniamy niskie pH i obecność enzymów trawiennych (pepsyny) w żołądku, niedobór tlenu i obecność żółci w jelicie cienkim a także obecność rodzimej mikroflory w dolnej części przewodu pokarmowego. Zdolność przetrwalników/komórek wegetatywnych *B. cereus* do przylegania do enterocytów i możliwa interakcja między komórkami wegetatywnymi tego gatunku a komórkami nabłonka jelita to również aspekty przyczyniające się do wywołania zatrucia pokarmowego *B. cereus*. Zagadnienia te omówiono w artykule przeglądowym II4A2.

Wpływ temperatury na możliwość wzrostu *B. cereus* scharakteryzowano w publikacji II4B2. Ze względu na zdolność wzrostu w różnym zakresie temperatury wyróżnia się następujące grupy fizjologiczne *B. cereus*: 1. szczepy zdolne do wzrostu w temperaturze 6 °C w czasie 10 dni, ale nie rozwijające się w temperaturze ponad 40 °C (szczepy typowo psychrotrofowe), 2. szczepy zdolne do wzrostu zarówno w temperaturze 6 °C, jak i powyżej 40 °C oraz 3. szczepy zdolne do wzrostu w temperaturze powyżej 40 °C i nie wykazujące cech psychrotrofowych (szczepy typowo mezofilne) [García-Armesto i Sutherland 1997]. Uwzględniając ten podział wykazano, że wśród szczepów wyizolowanych ze środowiska i mleka surowego przeważają szczepy o charakterze mezofilnym, natomiast szczepy pochodzące z produktów mlecznych (mleka spożywczego pasteryzowanego i serów pleśniowych) częściej wykazują charakter psychrotrofowy. Wzrost pojedynczych szczepów wyizolowanych z kału krów i mleka surowego stwierdzono w temperaturze 8 °C dopiero 7-8 dnia inkubacji (brak wzrostu w temperaturze 4-6 °C/10 dni). Wśród szczepów z mleka pasteryzowanego i serów pleśniowych wzrost w temperaturze 6 °C stwierdzono u pojedynczych szczepów już w 4-6 dniu inkubacji. W temperaturze 43 °C określono wzrost 98-100% szczepów z kału krów i mleka surowego oraz 79% i 64% szczepów wyizolowanych odpowiednio z mleka pasteryzowanego i serów.

W publikacji II4A8 określono występowanie *B. cereus* w 585 próbkach różnych produktów spożywczych (zioła i przyprawy, płatki śniadaniowe, makarony, ryż, preparaty do żywienia dla niemowląt, mleko pasteryzowane, świeże sery kwasowe i kwasowo-podpuszczkowe, sery pleśniowe i sery podpuszczkowe dojrzewające). Wśród 1022 izolatów *B. cereus* określono zdolność hydrolizy kazeiny, skrobi i tributyriny, fermentacji laktozy, wzrostu w temperaturze 7 °C/10 dni, wytwarzania toksyn Nhe i Hbl oraz posiadania genu *ces*. Obecność *B. cereus* stwierdzono w 39% analizowanych próbek w zakresie od 0,3 do 3,8 log jtk/g lub ml. Blisko połowa izolatów było zdolnych do fermentacji laktozy, 36% - do wytwarzania amylazy, 99% - do rozkładu kazeiny, 80% - do tributyriny i 25% - do wzrostu w temperaturze 7 °C/10 dni, co wskazuje na ich potencjał do rozwoju i ograniczanie jakości produktów spożywczych. Stwierdzono również występowanie toksynogennych szczepów *B. cereus* we wszystkich badanych produktach



spożywczych, zarówno roślinnych [55,8% izolatów - Hbl(+), 70,7% - Nhe(+) i 1,7% - ces(+)] jak i zwierzęcych [84,9% izolatów - Hbl(+), 82,7% - Nhe(+) i 0,9% - ces(+)] co wskazuje na możliwe ryzyko infekcji/zatrucia pokarmowych występujących w wyniku rozwoju *B. cereus* w sprzyjających warunkach, jak również spożywania takich produktów. Odsetek toksyno-dodatnich szczepów *B. cereus* podawany w literaturze jest bardzo zróżnicowany [Ankolekar i wsp. 2009, Chaves i wsp. 2012, Fogelego i wsp. 2018, Frentzel i wsp. 2018, Organji i wsp. 2015, Reyes i wsp. 2007].

Piśmiennictwo:

1. Agata N., Ohta M., Mori M., Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995, 129, 17-20.
2. Ankolekar Ch., Rahmati T., Labbé R. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in *S. rice*. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 128, 460-466.
3. Barbosa T., Serra C., La Ragione R., Woodward M., Henriques A. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 968-978.
4. Beecher D., Olsen T., Somers E., Wong A. Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infect. Immun.* 2000, 68, 5269-5276.
5. Beecher D., Schoeni J., Lee Wong A. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 1995, 63, 4423-4428.
6. Chaves J.Q., Cavados C.F.G., Vivoni A.M. Molecular and toxigenic characterization of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from commercial ground roasted coffee. *J. Food Protect.* 2012, 75, 518-522.
7. Choma C., Guinebretiere M.H., Carlin F., Schmitt P., Velge P., Granum P.E. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88, 617-625.
8. EFSA. Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs, *EFSA J.* 2005, 1-48.
9. Fogelego B., Granta R., Valciņa O., Bērziņš A. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control* 2018, 83, 69-74.
10. Frentzel H., Kraushaar B., Krause G., Bodi D., Wichmann-Schauer H., Appel B., Mader A. Phylogenetic and toxinogenic characteristics of *Bacillus cereus* group members isolated from spices and herbs. *Food Control* 2018, 83, 90-98.
11. García-Armesto M.R., Sutherland A.D. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. *J. Dairy Res.* 1997, 64(2), 261-270.
12. Hardy S., Lund T., Granum P. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, 197, 47-51.
13. Lund T., DeBuyser M., Granum P. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 38, 2000, 254-261.
14. Organji S.R., Abulreesh H.H., Elbanna K., Osman G.E.H., Khider M. Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2015, 5, 515-520.
15. Reyes J.E., Bastias J.M., Gutierrez M.R., Rodriguez M.D.O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean school feeding program. *Food Microbiol.* 2007, 24, 1-6.
16. Sarrias J.A., Valero M., Salmeron M.C. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiol.* 19, 2002, 589-595.
17. Stenfors Arnesen L., Fagerlund A., Granum P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 579-606.
18. Torre Del M., Della Corte M., Stecchini M.L. Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 63, 199-207.

#### 5.4. Wybrane aspekty technologiczne i jakościowe produkcji serów typu holenderskiego

Jeszcze w trakcie studiów doktoranckich brałam udział w pracach Zespołu kierowanego przez dr hab. Antoniego Plutę, prof. SGGW, badającego wpływ różnych zmian w procesie technologicznym produkcji serów typu holenderskiego o obniżonej zawartości tłuszczu na ich jakość. Badania z tego zakresu były prowadzone w ramach projektu celowego MNiSW nr 6ZR9 2008C/07148, realizowanych dla IBPRS w latach 2009-2012 (załącznik 4: II 9).

Dojrzewanie serów, to proces złożony i różnorodny. Dobór odpowiednich kultur starterowych jest bardzo ważny dla prawidłowego przebiegu zarówno początkowych etapów produkcji sera jak i dojrzewania.

Dojrzewanie serów trwa od kilku dni (sery miękkie) do ponad 2 lat (sery bardzo twarde) w zależności od gatunku sera. Do najczęściej stosowanych metod przyspieszania dojrzewania serów należą: dodatek preparatów enzymatycznych, zastosowanie zwiększonej populacji wyselekcjonowanych drobnoustrojów, dodatek genetycznie modyfikowanych starterów oraz dodatek, oprócz podstawowego startera osłabionych kultur LAB. Najprostszym w zastosowaniu sposobem umożliwiającym przyspieszenie procesu dojrzewania jest podwyższenie temperatury dojrzewania jednak rozwiązanie takie przyczynia się do powstawania wielu wad sera [El Soda 2002, Law 2001].

Rola kultur starterowych w procesie produkcji serów podpuszczkowych jest dość dobrze poznana. Główną ich funkcją jest wstępne ukwaszenie mleka i ułatwienie działania podpuszczki, zintensyfikowanie synergii skrzepu, ukwaszenie masy serowej oraz wytworzenie w czasie dojrzewania charakterystycznych cech sera. W celu przyspieszenia procesu dojrzewania nie można stosować nadmiernie zwiększonej ilości startera lub dodatkowych zbyt aktywnych kultur LAB. Zbyt dużo aktywnych bakterii mlekowych oznacza zwiększone i zbyt szybkie wytwarzanie kwasu mlekowego w początkowych etapach produkcji sera i może prowadzić do przekwaszenia masy serowej. Osłabianie aktywności fermentacyjnej dodatkowych kultur LAB, przy zachowanej aktywności proteolitycznej można osiągnąć poprzez ich mrożenie lub obróbkę cieplną [Klein i Lortal 1999, Law 2001, El-Tanboly i wsp. 2010]. W publikacjach przeglądowych II4B7 i II4B8 przedstawiono złożony system proteolityczny bakterii kwasu mlekowego a w publikacji II4B10 scharakteryzowano metody przyspieszania dojrzewania serów.

Zastosowanie dodatkowych, pozbawionych aktywności fermentacyjnej starterów w produkcji serów jest znane od wielu lat. Jednak w badaniach z tego zakresu stosowano stosunkowo niską temperaturę i krótki czas obróbki cieplnej dodatkowych starterów (kilka – kilkanaście sekund) co pozwalało zachować ich wysoką aktywność proteolityczną [El-Etriby i wsp. 1998, Farkye i wsp. 1995, Fox i wsp. 1996, Klein i Lortal 1999, Salomskiene 1998, Skeie i wsp. 1995, 1997]. Rozwiązanie takie w wielu przypadkach ma dwie wady. Po pierwsze, zachowana wysoka aktywność proteolityczna dodatkowego ogrzewanego startera może powodować zbyt intensywne przyspieszanie dojrzewania sera co bardzo często powoduje wady smakowo-zapachowe na skutek nagromadzenia gorzkich peptydów. Po drugie, inaktywacja aktywności fermentacyjnej dodatkowych starterów w czasie kilku – kilkunastu sekund wymaga stosowania dodatkowych ciągłych wymienników ciepła o małych wydajnościach, co może być kosztowne inwestycyjnie i uciążliwe eksploatacyjnie (kontrola automatyki, mycie itp.). Zastosowanie dodatkowego startera poddanego obróbce cieplnej sięgającej kilkudziesięciu minut w zakresie temperatury od 50 do 80 °C, czyli znacznie dłuższej niż w znanych rozwiązaniach, pozwala na realizowanie tego procesu metodą periodyczną w mateczniku, co zostało zaproponowane w patencie nr 219408 pt: "Sposób otrzymywania sera dojrzewającego, sposób otrzymywania zakwasu, zakwas i ser dojrzewający" (załącznik 4: III.3), którego byłam współautorem.

Potrzeba realizacji tego rodzaju badań wynika z trudności w produkcji serów o obniżonej zawartości tłuszczu o wysokich cechach jakościowych. Obróbka cieplna dodatkowego startera (przy odpowiedniej temperaturze i wydłużonym czasie ogrzewania) wpływać może na uzyskanie odpowiedniej aktywności proteolitycznej, co byłoby korzystne z punktu widzenia dojrzewania sera i jego cech sensorycznych. W początkowych badaniach z tego zakresu (załącznik 4: II4A1) porównano aktywność dipeptydaz powszechnie stosowanych handlowych starterów CHN-19 oraz XT-312 (Chr. Hansen), które poddano obróbce cieplnej w czasie 15 sekund lub 10 minut w temperaturze w zakresie od 50 do 80 °C. Wykazano, że poddana obróbce cieplnej w zakresie 50-80 °C kultura CHN-19 zachowywała w stosunkowo dużym stopniu aktywność proteolityczną. Peptydazy obu badanych starterów charakteryzowała wysoka specyficzność substratowa wobec dipeptydów zawierających aminokwasy hydrofobowe, takie jak leucynę i fenyloalaninę,

których obecność często stwierdzana jest w gorzkich peptydach. Aktywność tych dipeptydaz stwierdzono także po obróbce cieplnej, nawet w temperaturze 80 °C przez 10 minut. Dodatkowo stwierdzono, że obróbka termiczna starterów opóźniała wzrost bakterii od kilku do kilkunastu godzin, co może być pozytywne z punktu widzenia produkcji serów podpuszczkowych, ponieważ dodatkowa biomasa komórek bakterii, niezdolna do wzrostu w początkowych etapach produkcji serów, ale posiadająca aktywne enzymy peptydolityczne, przyspiesza dojrzewanie sera i zapobiega gromadzeniu gorzkich peptydów w masie serowej. W kolejnych badaniach (załącznik 4: II4B11) określono aktywności amino- i dipeptydaz wybranych kultur starterowych (*Lactobacillus casei* – 431, F-DVS, CRL-431 oraz *Lactobacillus acidophilus* LA-5, FD-DVS, firmy Chr. Hansen), poddanych działaniu temperatury 50 - 75 °C, przez 1, 15 i 25 minut. Badane kultury starterowe *Lactobacillus* syntetyzowały peptydazy o podobnej specyficzności substratowej, ale z różną aktywnością. Wykazywały one wyższą aktywność aminopeptydaz w porównaniu z aktywnością dipeptydaz. Średnia aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* LA-5 była wyższa o 45% od średniej aktywności bakterii *Lb. casei* – 431. Wyższą o 25% aktywnością aminopeptydaz charakteryzował się *Lb. casei* – 431 w porównaniu z *Lb. acidophilus* LA-5. Starter ten wykazywał największą specyficzność względem substratów: Ala-Leu, Ala-Ala, Gly-Leu, natomiast *Lb. acidophilus* – względem Ala-Ala oraz Ala-pNa. Najwyższą aktywność amino- i dipeptydaz *Lb. casei* – 431 oraz dipeptydaz *Lb. acidophilus* LA-5 stwierdzono po obróbce cieplnej bakterii przez 15 min. Z kolei średnia aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus* LA-5 wzrastała wraz z wydłużaniem czasu ogrzewania – najwyższe jej wartości uzyskano po 25 minutach. Wykazano, że wydłużenie czasu obróbki termicznej wpłynęło istotnie na wzrost aktywności aminopeptydaz badanych kultur starterowych, co wskazuje na ich wysoką termostabilność.

W kolejnych badaniach (załącznik 4: II4B6) określono wpływ temperatury ogrzewania na zdolności proteolityczne handlowego startera XT-312. Badania przeprowadzono na otrzymanych w warunkach laboratoryjnych modelach serów. Oznaczenie aktywności proteolitycznych wykonywano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem kwasu 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowego (TNBS). Obróbkę cieplną dodatkowego startera XT-312 prowadzono w temperaturze 55-75 °C w czasie 10 min. Otrzymano także modele serów zawierające dodatkowe nieogrzewane (aktywne) kultury bakterii z gatunku *Lactobacillus casei*. Stwierdzono, że bakterie mlekowe wchodzące w skład startera XT-312 wykazywały słabsze właściwości proteolityczne w porównaniu do bakterii *Lb. casei*. Określono również, że na aktywność proteolityczną dodatkowego startera XT-312 bardziej istotny wpływ niż temperatura obróbki cieplnej, wywierał czas dojrzewania serów. W kolejnych badaniach (załącznik 4: II4A4) określono wpływ dodatkowego startera XT-312 ogrzewanego w temperaturze 65 °C przez 10 lub 30 minut na wybrane cechy jakościowe serów typu holenderskiego o obniżonej zawartości tłuszczu otrzymanych w warunkach przemysłowych. Określono zawartość: azotu rozpuszczalnego przy pH 4,6, azotu rozpuszczalnego w kwasie trichlorooctowym (TCA) i azotu amoniakalnego, zmiany mikrobiologiczne, teksturalne i sensoryczne. Zastosowanie w produkcji sera dodatkowego startera XT-312 poddanego obróbce cieplnej w temperaturze 65 °C zarówno w czasie 10 jak i 30 minut przyspieszało dojrzewanie serów w porównaniu do serów kontrolnych. Zawartość wszystkich badanych form związków azotowych była istotnie większa w serach wyprodukowanych z zastosowaniem dodatkowego ogrzewanego startera. Zastosowanie dodatkowego ogrzewanego startera XT-312 poprawiało cechy sensoryczne i teksturalne (znacznie zmniejszyło twardość serów w porównaniu z serami kontrolnymi) serów typu holenderskiego o obniżonej zawartości tłuszczu. Zazwyczaj konsekwencją obniżania kaloryczności (zawartości tłuszczu) serów typu holenderskiego jest wzrost twardości serów [Fenelon i Guinee 2000, Küçüköner i Haque 2003]. Stwierdzono, że kultury starterowe poddane obróbce cieplnej w temperaturze 65 °C i w czasie dłuższym niż 10 minut mogą być wykorzystywane jako dodatkowe źródło enzymów przyspieszających proces dojrzewania i poprawiających

cechy sensoryczne. Wydłużony czas (powyżej 10 minut) obróbki cieplnej dodatkowego startera jest korzystny ze względów praktycznych, ponieważ obróbka taka może być prowadzona w warunkach przemysłowych w maceczniku i nie wymaga jak w przypadku krótkich czasów (do kilkunastu sekund) zastosowania dodatkowej linii pasteryzacyjnej w przepływie. Dobrze dobrana nieaktywna fermentacyjnie kultura może stanowić także, oprócz źródła enzymów, dodatkowe źródło związków aromatyzujących wnoszonych z kulturą.

#### Piśmiennictwo:

1. El Soda M. Accelerated cheese ripening. W: Encyclopedia of Dairy Science pod red. H. Rogiński, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Academic Press Amsterdam, tom 1, 2002, pp. 327-329.
2. El-Etriby H.M., Al-Khamy A.F., Zaghoul A.H., Shahein N.M., El-Sheikh M.M. Effect of heat-shocked starter on the ripening of UF Edam cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science* 1998, 26, 131-138.
3. El-Tanboly El-S., El-Hofi M., Youssef Y.B., El-Desoki W., Jalil RA. Influence of freeze-shocked mesophilic lactic starter bacteria and adjunct lactobacilli on the rate of ripening Gouda cheese and flavor development. *Journal of American Science* 2010, 6(11), 465-471.
4. Farkye N., Madkor S., Atkins H. Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in model cheese system. *Int. Dairy J.* 1995, 5, 715-725.
5. Fenelon M.A., Guinee T.P. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat content. *Int. Dairy J.* 2000, 10, 151-158.
6. Fox P.F., Wallance J.M., Morgan S., Lynch C.M., Niland E.J., Tobin J. Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996, 70, 271-297.
7. Klein N, Lortal S. Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening – a review. *Int. Dairy J.* 1999, 9, 751-762.
8. Küçükköner E., Haque Z.U. Physico-chemical and rheological properties of full fat and low fat Edam cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 2003, 217, 281-286.
9. Law B.A. Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for New technology. *Int. Dairy J.* 2001, 11, 383-398.
10. Salomskiene J. Use of heat-treated starter for the intensification of cheese ripening. *Milchwissenschaft* 1998, 53, 28-30.
11. Skeie S., Narvhus J., Ardö Y., Abrahamsen R.K. Influence of liposome – encapsulated Neutrase and heat-treated lactobacilli on quality of low-fat Gouda-type cheese. *J. Dairy Res.* 1995, 62, 131-139.
12. Skeie S., Narvhus J., Ardö Y., Thorvaldsen K., Abrahamsen R.K. The effect of reduced salt content on the function of liposome-encapsulated Neutrase and heat-treated lactobacilli in rindless low-fat cheese. *Lait* 1997, 77, 575-585.

#### 5.5. Wybrane aspekty bezpieczeństwa mikrobiologicznego i właściwości prozdrowotnych żywności

Od początku mojej pracy prowadziłam badania poświęcone określaniu jakości mikrobiologicznej różnych produktów spożywczych. Wyniki posłużyły do przygotowania czterech doniesień sesyjnych, szczegółowo z zakresu: jakości serów podpuszczkowych dojrzewających, mleka, preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci oraz przypraw i ziół (II7).

Aspektem zagrożeń związanych z występowaniem bakterii patogennych takich jak *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* w produktach żywnościowych poświęciłam trzy artykuły przeglądowe (II4B1, II4B3 i II4B9).

W ostatnim czasie wraz z członkami zespołu prowadziłam badania (II4A15) dotyczące oceny przeżywalności probiotycznych szczepów LAB (*Bifidobacterium* BB-12, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*) pochodzących z preparatów probiotyków komercyjnych w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego człowieka. Probiotyki polecane są m.in. w diecie dzieci poddawanych antybiotykoterapii, cierpiących na alergię pokarmową czy biegunki podróżnych. W przypadku małych dzieci przy przyjmowaniu preparatu probiotycznego zaleca się usunięcie specjalnej kapsułki, która chroni bakterie probiotyczne przed warunkami panującymi w górnym odcinku przewodu pokarmowego człowieka. Jednak usunięcie tej kapsułki może osłabić przeżywalność bakterii i zmniejszyć skuteczność ich działania w organizmie dziecka. Wykazano, że spośród analizowanych komercyjnych bakterii probiotycznych tylko szczep *Lb. plantarum* był odporny na zastosowane warunki symulujące przewód pokarmowy człowieka.

## 5.6. Podsumowanie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W ramach pracy doktorskiej, a zwłaszcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych nieustannie doskonaliłam swój warsztat, prowadząc badania z zakresu mikrobiologii produktów spożywczych, jak również technologii produktów mlecznych. Byłam autorką lub współautorką koncepcji większości prowadzonych przez mnie badań. Badania realizowałam samodzielnie lub we współpracy ze specjalistami w dziedzinie mikrobiologii, genetyki i biotechnologii z ośrodków krajowych (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie oraz Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie) oraz zagranicznych (School of Science and Technology w Nottingham Trent University, UK, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Department of General Biology and Genomics w Kazachstanie).

Mój dotychczasowy dorobek naukowy przedstawiłam w Tabeli 1 i 2.

Tabela 1. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego

Publikacje (z uwzględnieniem prac wykazanych jako osiągnięcie naukowe)									
Kategoria	Przed doktoratem			Po doktoracie			Łącznie		
	liczba	IF	pkt. MEiN	liczba	IF	pkt. MEiN	liczba	IF	pkt. MEiN
Oryginalne prace twórcze z IF	-	-	-	15	50,320	1260	15	50,320	1260
Oryginalne prace twórcze bez IF	3	-	26	1	-	13	4	-	39
Publikacje przeglądowe z IF	-	-	-	2	2,835	40	2	2,835	40
Publikacje przeglądowe bez IF	1	-	4	7	-	57	8	-	61
Rozdziały w monografiach	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Razem publikacje</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>30</b>	<b>25</b>	<b>53,155</b>	<b>1370</b>	<b>29</b>	<b>53,155</b>	<b>1400</b>
Patenty, komunikaty konferencyjne, inne									
Patenty	-	-	-	1	-	25	1	-	25
Postery	11	-	-	10	-	-	21	-	-
komunikaty ustne (referaty)	-	-	-	2	-	-	2	-	-
sekwencje DNA zdeponowane w GenBank	-	-	-	1	-	-	1	-	-
udział w projektach badawczych i badawczo-rozwojowych	1	-	-	1	-	-	2	-	-
udział w projektach dydaktycznych	-	-	-	1	-	-	1	-	-
artykuły popularno-naukowe	2	-	-	-	-	-	2	-	-
<b>Razem</b>	<b>14</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>16</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>30</b>	<b>-</b>	<b>25</b>
<b>ŁĄCZNIE</b>								<b>1425</b>	

Tabela 2. Zestawienie prac twórczych

l.p.	nazwa czasopisma	liczba publikacji	IF	punkty wg. MEiN	numer publikacji
<i>przed doktoratem</i>					
1	Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego 2008	1	-	4	II4B1
2	Medycyna Weterynaryjna 2008	1	-	10	II4B2
	2010	1	-	10	II4B5
3	Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 2011	1	-	6	II4B6
4	Doniesienia zgłoszone na konferencjach krajowych/międzynarodowych	11	-	-	II7B1 - II7B11
5	Artykuły popularno-naukowe	2	-	-	II4B3, II4B4
<i>Razem przed doktoratem</i>		17	-	30	-
<i>po doktoracie</i>					
1	Applied Biochemistry and Biotechnology 2015	1	1,606	20	II4A1
2	Microbial Pathogenesis 2015	1	1,888	20	II4A2
3	Food Microbiology 2015	1	3,331	35	II4A3
	2017	1	4,090	40	II4A5
4	LWT - Food Science and Technology 2016	1	2,711	35	II4A4
5	European Food Research and Technology 2019	1	2,366	70	II4A6
7	Postępy Mikrobiologii 2019	1	0,947	20	II4A7
8	Foods 2019	1	4,092	100	II4A8
9	Applied Sciences-Basel 2019	1	2,474	100	II4A9 H1
10	Food Bioscience 2020	1	4,240	70	II4A10 H2
11	Molecules 2020	1	4,412	140	II4A11 H4
12	Materials 2020	1	3,623	140	II4A12 H5
13	Polymers 2020	1	4,329	100	II4A13
14	Animals 2021	1	2,752	100	II4A14 H3
15	International Journal of Environmental Research and Public Health 2021	1	3,390	140	II4A15
16	Frontiers in Veterinary Science 2021	1	3,412	70	II4A16
17	Pathogens 2021	1	3,492	100	II4A17

18	Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego 2012	2	-	-	II4B7 II4B8
19	Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego 2013 2021 2022	1 1 1	- - -	2 20 20	II4B9 II4B13 II4B14
20	Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 2014 2018	1 1	- -	2 13	II4B10 II4B12
21	Żywność Nauka Technologia Jakość 2015	1	-	13	II4B11
22	Patenty 2015	1	-	25	III3
23	Referaty wygłoszone na konferencjach krajowych i międzynarodowych	2	-	-	II7B16 II7B20
24	Doniesienia zgłoszone na konferencjach krajowych/międzynarodowych	10	-	-	II7B12 - II7B15 II7B17 - II7B19 II7B21 - II7B23
<i>Razem po doktoracie</i>				53,155	1395
<b>Razem</b>				<b>53,155</b>	<b>1425</b>

- po wyłączeniu 5 prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe (IF=17,501, 550 pkt. MEiN), wartość mojego pozostałego dorobku naukowego osiąga IF=35,654 i 875 pkt. MEiN, z czego dla prac opublikowanych po doktoracie IF=35,654, liczba punktów MEiN – 845.
- Index Hirscha wg Web of Science - 6
- *h*-index wg Scopus - 7
- liczba cytowań na podstawie Web of Science -198 (z pominięciem autocytowań – 180), z dnia 07.06.22
- liczba cytowań na podstawie Scopus - 212.

## 6. Inne osiągnięcia związane z aktywnością dydaktyczną i organizacyjną

### 6.1. Działalność dydaktyczna

Zajęcia dydaktyczne prowadziłam już w latach 2007 – 2011 w ramach studiów doktoranckich. W ramach pracy na stanowisku adiunkta w Instytucie Nauk o Żywności SGGW w Warszawie, prowadzę zajęcia dydaktyczne ze studentami I i II stopnia trybu stacjonarnego, niestacjonarnego kierunku *Technologia żywności i żywienie człowieka* na Wydziale Technologii Żywności (WTŻ), a także na kierunku *Bezpieczeństwo żywności oraz Towaroznawstwo w biogospodarce*, realizowanych również na WTŻ. Zajęcia dydaktyczne z zakresu podstaw przetwórstwa mleka prowadzę również dla studentów studiów stacjonarnych I stopnia kierunku *Zootechnika*, realizowanego na Wydziale Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt SGGW w Warszawie. Zajęcia dydaktyczne prowadzę także dla studentów Wydziału Biologii i Biotechnologii (kierunek *Biotechnologia*, kierunek *Biologia*).

Obecnie realizuję zajęcia prowadzone na WTŻ SGGW dla studentów kierunku a) *Technologia żywności i żywienie człowieka* z następujących przedmiotów: Propedeutyka przemysłu spożywczego, Ogólna technologia żywności, Technologia mleka, Współczesne technologie, Techniki analityczne w technologii mleczarskiej, Specjalizacyjny projekt, Konwersatorium dyplomowe, Podstawy metodologii badań doświadczalnych, Podstawy opracowywania wyników badań naukowych, Mikrobiologia

i biotechnologia w mleczarstwie, Wybrane zagadnienia z technologii mleczarskiej, Surowce pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, Przetwórstwo surowców roślinnych i zwierzęcych, Ocena jakości produktów i logistyka, kierunku b) *Bezpieczeństwo żywności* z przedmiotów: Technologia i higiena żywności pochodzenia zwierzęcego, Ogólna technologia żywności i kierunku c) *Towaroznawstwo w biogospodarce* z przedmiotów Towaroznawstwo żywności i Towaroznawstwo produktów rolniczych pochodzenia zwierzęcego. Liczba zrealizowanych przeze mnie godzin dydaktycznych w każdym roku pracy wynosiła średnio około 260.

Od 2019 jestem koordynatorem ćwiczeń z przedmiotu Technologia mleka, realizowanego dla studentów studiów I stopnia oraz z przedmiotów: Jakość i bezpieczeństwo w technologii produktów pochodzenia zwierzęcego, Mikrobiologia i biotechnologia w mleczarstwie, Wybrane zagadnienia z technologii mleczarskiej, Surowce pochodzenia zwierzęcego oraz Przetwórstwo surowców pochodzenia zwierzęcego dla studentów II stopnia kierunku *Technologia żywności i żywienie człowieka*.

Byłam promotorem 9 prac magisterskich oraz 5 prac inżynierskich na kierunku *Technologia żywności i żywienie człowieka*, 3 prac inżynierskich na kierunku *Bezpieczeństwo żywności* (kierunki realizowane na WTŻ oraz w trakcie pracy w IBPRS byłam promotorem 2 prac magisterskich zrealizowanych na Politechnice Warszawskiej (Wydział Chemiczny, kierunek *Biotechnologia*) oraz w SGGW (Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, kierunek *Biotechnologia*).

Od 2021 r. pełnię funkcję opiekuna roku studentów studiów niestacjonarnych kierunku *Technologia żywności i żywienia człowieka* WTŻ SGGW w Warszawie.

W ankietach przeprowadzanych corocznie moja praca dydaktyczna jest wysoko oceniana przez Studentów. Wysoko oceniana byłam także w czasie hospitacji prowadzonych przeze mnie zajęć ćwiczeniowych.

Jestem współautorem 2 rozdziałów w materiałach do nowych ćwiczeń w j. angielskim z przedmiotu Processing of organic animal raw materials, realizowanego na kierunku *Organic Agriculture and Food Production* (anglojęzyczne studia stacjonarne, I stopnia).

Aktywnie uczestniczę w różnych wydarzeniach promujących naukę. Byłam członkiem komisji oceniającej blok tematyczny „Technologia żywności” w czasie XLIV i XLV edycji Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych dla uczniów szkół średnich odbywających się w 2021 i 2022 odpowiednio. Brałam aktywny udział w wydarzeniach promujących nauki ścisłe wśród młodzieży, np. przygotowaniu na WTŻ oferty zajęć w ramach tzw. "Otwartych Laboratoriów".

Swoje umiejętności dydaktyczne doskonaliłam, uczestnicząc w kursach, szkoleniach i warsztatach. Do najważniejszych należy zaliczyć ukończenie Podyplomowego Studium Pedagogicznego SGGW w 2010 r. oraz uczestniczenie w programie edukacyjnym Intensive Program Broadening the Skills in Food Sanitary Safety (IP-218726-08), Universiteit Gent, Belgia w 2009 r. Brałam udział w szkoleniach pt. „Nauczyciele akademicy SGGW wobec studentów niepełnosprawnych” (13 luty 2020 r.) oraz „Kontakt ze studentami z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ASD)” (27 września 2021 r.). Odbyłam także szkolenie z zakresu statystycznej analizy danych w programie STATISTICA w 2008 r. oraz szkolenie z zakresu zintegrowanych systemów zarządzania jakością w przemyśle spożywczym w 2008 r. Brałam również udział w I Ogólnopolskich Warsztatach „Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska” w 2008 r.

## 6.2. Działalność organizacyjna

Obok działalności naukowej i dydaktycznej istotnym elementem mojej aktywności zawodowej jest działalność organizacyjna. W czasie pracy w IBPRS zostałam powołana przez Dyrektora Instytutu prof. dr



hab. Artura H. Świergiela na członka komisji przeprowadzającej audyt Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Zakładu Mikrobiologii IBPRS, jak również do zespołu konsultującego prace naprawcze w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych.

Za najważniejsze osiągnięcie w zakresie działalności organizacyjnej, wpisujące się także w działalność o charakterze edukacyjnym, uważam pracę w ramach projektu pt.: "*Innowacyjny Obóz Naukowy SmartUp*" finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, w ramach Działania 3.1 „Kompetencje w szkolnictwie wyższym” "Trzecia Misja Uczelni" (nr projektu WND-POWR.03.01.00-00-T023/18-01). Projekt, dofinansowany na poziomie około 730 tys. PLN, rozpoczął się 01.09.2018 r., a zakończył 31.10.2022 r. W projekcie pełniłam rolę koordynatora ds. administracyjno-organizacyjnych. Celem projektu było podniesienie i rozwój, wśród uzdolnionej młodzieży (w wieku 15-19 lat), kompetencji pozwalających na poszerzenie wiedzy specjalistycznej z zakresu pasjonujących ich dziedzin nauk ścisłych i przyrodniczych, rozwój zainteresowań uczestników Projektu oraz pobudzenie ich aktywności edukacyjnej i kulturalnej. Powyższy cel realizowany był przez organizację 2-tygodniowych Obozów Naukowych, w czasie których uczestnicy mieli możliwość udziału w zajęciach teoretycznych i praktycznych, które pozwoliły im na rozwój wiedzy i budowanie kompetencji kluczowych, niezbędnych na kolejnych etapach edukacji. Podczas Obozu uczestnicy podzieleni byli na 4 grupy w ramach ścieżek edukacyjnych z zakresu: medycyny i nauk medycznych, chemii i biochemii, robotyki i programowania oraz fizyki i nowych technologii. Zajęcia prowadzili wykładowcy z najlepszych uczelni w Polsce (m.in. SGGW w Warszawie, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i Politechniki Warszawskiej) oraz z Europy (Cambridge University, Oxford University, University College London, Imperial College London, University of Edinburgh).

Uczestniczę jako sekretarz w pracach Uczelnianej Komisji Wyborczej ds. dyscypliny Technologia żywności i żywienia (powołanej na okres od 1.09.2020 r. do 31.08.2024 r.) oraz w działaniach mających na celu promocję Wydziału Technologii Żywności oraz mojej macierzystej Uczelni na przykład w czasie Dni SGGW czy Dni Otwartych SGGW.

W 2019 r. na podstawie uchwały Rady Programowej zostałam powołana na członka zespołu ds. promocji Wydziału Technologii Żywności, w którego pracach uczestniczę do chwili obecnej.

Dodatkowo w 2019 r. zaangażowałam się w prace związane z przygotowaniem Raportu Samooceny kierunku *Technologia żywności i żywienie człowieka* oraz kierunku *Bezpieczeństwo żywności*. Od momentu mojego zatrudnienia w SGGW włączyłam się w prace związane z przygotowywaniem planów i sprawozdań z dydaktyki w Zakładzie Technologii Mleka.

### 6.3. Działalność w towarzystwach naukowych i zespołach eksperckich

Od momentu zatrudnienia w SGGW jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności. Dodatkowo od 2019 r. jestem członkiem lokalnego panelu doradczego (Topical Advisory Panel Member), Foods (MDPI). We wrześniu 2021 r. zostałam także powołana na specjalistę/eksperta do przygotowania opinii o społeczno-gospodarczej potrzebie włączenia kwalifikacji pt.: „Farmerskie wyrabianie serów i innych produktów z mleka – Serowar farmerski” do Zintegrowanego Systemu Kwalifikacji przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Departament Rynków Rolnych w Warszawie.

### 6.4. Otrzymane nagrody i wyróżnienia

W czasie pracy w SGGW otrzymałam Nagrodę JM Rektora SGGW w Warszawie Zespołową Stopnia II za osiągnięcia badawcze w 2021 r. Dodatkowo uzyskałam wyróżnienie JM Rektora SGGW za dotychczasowe

osiągnięcia naukowe, wpływające znacząco na rozwój, promocję oraz prestiż SGGW i od dnia 1.01.2021 r. do dnia 31.12.2021 r. pobierałam z tego tytułu dodatkowe wynagrodzenie.

#### 6.5. Współpraca z ośrodkami naukowymi polskimi i zagranicznymi, recenzje publikacji

Od 2016 r. współpracuję z dr Iloną Stefańską z Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie w ramach badań nad identyfikacją genetyczną izolatów *Cronobacter* spp. na podstawie sekwencjonowania 16S rDNA, analizy PCR-RFLP i analizy RAPD-PCR, co zaowocowało publikacjami II4A5 i II4A17. W 2017 r., po ukazaniu się publikacji II4A5, nawiązałam współpracę naukową z wybitnym specjalistą z zakresu systematyki, charakterystyki fenotypowej i genetycznej oraz patogenności bakterii należących do rodzaju *Cronobacter*, prof. Stephenem J. Forsythe'em i dr Pauline Ogrodzki z School of Science and Technology w Nottingham Trent University (UK). W ramach tej współpracy potwierdzona została metodą MLST prawidłowa klasyfikacja szczepu *Cronobacter* s37, wyizolowanego z kiełków rzodkiewki do gatunku *Cronobacter condimenti*. Wyizolowany przez nasz zespół szczep *Cronobacter condimenti* s37 jest drugim wyizolowanym na świecie szczepem z tego gatunku. Dzięki współpracy z Prof. S. Forsythe'em i dr P. Ogrodzki, a także z dr hab. Tamarą Aleksandrak-Piekarczyk z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, szczep umieszczono w bazie *Cronobacter* PubMLST pod numerem ID 1896, a następnie w DDBJ/ENA/GenBank pod numerem akcesyjnym RQEO01000001-RQEO01000043.

Współpraca z dr hab. T. Aleksandrak-Piekarczyk z IBB PAN była kontynuowana w ramach prac badawczych nad określeniem jakości mikrobiologicznej orzechów, nasion i suszonych owoców ze szczególnym uwzględnieniem występowania *Cronobacter* spp. (publikacja II4A17).

Od 2020 r. współpracuję z mgr Gulden Nagmetovą i profesorem Askarem Kurmanbayevem z ośrodka naukowego L.N. Gumilyov Eurasian National University, Department of General Biology and Genomics, Kazakhstan w ramach prac badawczych nad aktywnością przeciwdrobnoustrojową biocelulozy z dodatkiem olejku oregano wobec szczepów *Cronobacter* spp., których wyniki opublikowano w publikacji II4A13.

Wykonałam ponadto 77 recenzji publikacji naukowych dla takich czasopism zagranicznych jak: Food Research International, International Journal of Food Microbiology, Food Chemistry, European Food Research and Technology, Journal of Food Science and Technology, Frontiers in Veterinary Sciences (FRONTIERS), Molecules (MDPI), Biomolecules (MDPI), Foods (MDPI), Applied Science (MDPI), Pathogens (MDPI), Microorganisms (MDPI), Journal of Marine Science and Engineering (MDPI), Processes (MDPI), Separations (MDPI), Sustainability (MDPI), Journal of Clinical Medicine (MDPI), International Journal of Environmental Research and Public Health (MDPI), Fermentation (MDPI), Animals (MDPI) oraz Nutrients (MDPI).

#### 6.6. Współpraca z przemysłem

Obok aktywności naukowej i dydaktycznej realizuję się również, współpracując z podmiotami gospodarczymi. W moim dorobku jest sześć ekspertyz/opracowań wykonanych na zamówienie podmiotów zewnętrznych (załącznik 4: pkt. 5).

W 2009 r. zrealizowałam zlecone przez Instytut Przemysłu Organicznego w Warszawie „Badania mikrobiologiczne działania bromfenwinfosu i jego trzech zanieczyszczeń przeciwko dwunastu szczepom drobnoustrojów stosowanych w przemyśle spożywczym”. Badania dotyczyły określenia wpływu bromfenwinfosu i jego zanieczyszczeń, który jest substancją czynną leków weterynaryjnych przeciwko warrozie u pszczoł oraz zakażeniom pasożytniczym u zwierząt hodowlanych, na drobnoustroje celowo stosowane w przemyśle spożywczym, takie jak bakterie kwasu mlekowego oraz drożdże z gatunku

*Saccharomyces cerevisiae*. Badania stanowiły część projektu celowego nr 6 ZR7 2007/C06895 pt: "Uruchomienie produkcji substancji aktywnej - bromfenwinfos w Instytucie Przemysłu Organicznego i uruchomienie produkcji weterynaryjnego środka leczniczego do zwalczania warrozy u pszczoł w Biowet-Puławy". Współuczestniczyłam w zaplanowaniu eksperymentów, wykonaniu większości badań i przygotowaniu raportu dla zleceniodawcy. Raport ten był częścią wniosku o rejestrację weterynaryjnego środka leczniczego (zawierającego jako substancję aktywną - bromfenwinfos) w European Medicines Agency (EMA) w Londynie.

Współpracowałam z firmą ROBICO w Warszawie w ramach zlecenia na temat określenia przyczyn powstawania skłaceń w mleku pasteryzowanym (Załącznik 4: pkt. 5). W przypadku tego opracowania byłam odpowiedzialna za wykonanie badań oraz współtworzyłam ekspertyzy.

W latach 2008-2011 brałam udział w przygotowaniu ekspertyz dla Głównego Urzędu Cei dotyczących klasyfikacji produktów mleczarskich.

W 2019 r. współpracowałam z firmą DSM Food Specialities Poland Sp. z o.o. w Mszczonowie w ramach dwóch prac zleconych pt. „Badanie przydatności wybranych starterów bakterii kwasu mlekowego w produkcji tradycyjnych twarogów” oraz „Badanie przemysłowej przydatności wybranych kultur starterowych w produkcji serów kwasowych”. W przypadku tych opracowań byłam odpowiedzialna za wykonanie badań oraz współtworzyłam raporty.

W 2021 r. byłam współautorem opracowania „Eko – rozwiązania na jutro w sektorze rolno – spożywczym. Polskie Produkty dla transformacji do Gospodarki o Obiegu Zamkniętym” dla projektu współfinansowanego przez NCBiR w ramach pierwszego konkursu na projekty otwarte w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych "Społeczny i gospodarczy rozwój Polski w warunkach globalizujących się rynków GOSPOSTRATEG". Opracowanie wskaźników pomiarowych umożliwiających ocenę postępu w transformacji w kierunku gospodarki o obiegu zamkniętym oraz wpływu gospodarki o obiegu zamkniętym na rozwój społeczno-gospodarczy na poziomie mezoekonomicznym (regionów) i makroekonomicznym (gospodarki narodowej). Akronim oto – GOZ.

#### 6.7. Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki

W celu popularyzacji wiedzy o współczesnych trendach w technologii mleka publikowałam w czasopiśmie branżowych z sektora mleczarskiego, takich jak Przegląd Mleczarski oraz w innych periodykach o tematyce związanej z jakością produktów spożywczych (np. Przegląd Piekarski i Cukierniczy). Do tej pory ukazały się dwa artykuły popularno-naukowe z moim współautorstwem (II4B3, II4B4).

Garbowska Monika