

Autoreferat

Załącznik 2

dr inż. Dorota Zielińska

Warszawa, 2019

1. Dane personalne i przebieg pracy zawodowej

1.1. Imię i Nazwisko

Dorota Zielińska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 17.12.2008: **Doktor nauk rolniczych**; dyscyplina: technologia żywności i żywienia;
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności
- Temat pracy doktorskiej: Prognostyczne modele przeżywalności bakterii probiotycznych w fermentowanym napoju sojowym
07. 08. 2003: **Magister inżynier**; dyscyplina: technologia żywności i żywienia;
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności
- Temat pracy magisterskiej: Badanie przeżywalności szczepu probiotycznego *Lactobacillus acidophilus* w soku warzywnym

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

15.12.2010-obecnie:

Adiunkt; Pracownik naukowo-dydaktyczny, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności

01.03.2010-30.09.2012

Sekretarz Międzywydziałowego Studium Towaroznawstwa, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

15.12.2008-14.12.2010

Asystent; Pracownik naukowo-dydaktyczny, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności

Ponadto:

01.09.2003-14.12.2008

Studia doktoranckie; Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności

01.09.2003-14.12.2008

Nauczyciel przedmiotów zawodowych w Zespole Szkół Gastronomicznych im. E. Pijanowskiego, Warszawa, ul. Poznańska 6/8

4. Osiągnięcie naukowe

4.1. Wskazanie osiągnięcia naukowego:

Osiągnięciem naukowym zgodnie z art. 16 ust. 2 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.) jest powiązany tematycznie cykl publikacji naukowych pt.:

Właściwości funkcjonalne i technologiczne wyizolowanych z żywności szczepów bakterii fermentacji mlekowej, warunkujące ich działanie probiotyczne

4.2. Publikacje prezentujące wyniki badań stanowiące osiągnięcie habilitacyjne

H1. Zielińska D., Rzepkowska A., Radawska A., Zieliński K. (2015): *In vitro* screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber, *Current Microbiology*, 70, 2, 183-194.

| IF₂₀₁₅= 1,519; MNiSW₂₀₁₅ = 15 pkt., liczba cytowań WoS = 15

H2. Klindt-Toldam S., Larsen S.K., Saaby L., Olsen L.R., Svenstrup G., Müllertz A., Knøchel S., Heimdal H., Nielsen D.S., **Zielińska D.:** Survival of *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 encapsulated in chocolate during *in vitro* simulated passage of the upper gastrointestinal tract. *LWT - Food Science and Technology*, (2016) 74, 404-410.

| IF₂₀₁₆= 2,329; MNiSW₂₀₁₆ = 35 pkt., liczba cytowań WoS = 8

H3. Zielińska D., Długosz E., Zawistowska-Deniziak A. (2018): Functional properties of food-origin *Lactobacillus* in the gastro-intestinal ecosystem - *in vitro* study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9458-z>

| IF₂₀₁₈= 2,345; MNiSW₂₀₁₇ = 20 pkt., liczba cytowań WoS = 1

H4. Mituniewicz-Małek, A., Zielińska, D., Ziarno, M. (2019): Probiotic monocultures in fermented goat milk beverages—sensory quality of final product. *International Journal of Dairy Technology*. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12576>

| IF₂₀₁₈= 1,225; MNiSW₂₀₁₇ = 20 pkt., liczba cytowań WoS = 0

H5. Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D. (2018): Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties: review. *BioMed Research International*, Article ID 5063185, 15 pages.

| IF₂₀₁₈= 2,583; MNiSW₂₀₁₇ = 25 pkt., liczba cytowań WoS = 0

Łącznie publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe stanowią **115 punktów MNiSW** oraz **IF =10,001** (z roku opublikowania), **suma liczby cytowań wg WoS = 24**. We wszystkich pracach jestem autorem korespondencyjnym. Kopie prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji stanowiącego osiągnięcie naukowe wraz z oświadczeniami współautorów określających ich wkład w powstanie każdej publikacji stanowią Załącznik 5.

4.3.Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Jednym z szybciej rozwijających się i najbardziej obiecujących obszarów rozwoju nauki w ciągu ostatnich dwóch dekad w zakresie żywienia człowieka jest zastosowanie probiotyków i określenie ich wpływu na ludzkie zdrowie. Bakterie kwasu mlekowego (*ang. lactic acid bacteria –LAB*) są najczęściej stosowane jako probiotyki w żywności konwencjonalnej i w suplementach diety. Mechanizmy działania bakterii probiotycznych, dzięki którym oddziałują na zdrowie człowieka nie są w pełni wyjaśnione, ale mogą obejmować konkurencyjność w stosunku do patogenów jelitowych, rozkład czynników rakotwórczych i anty-żywnościowych, produkcję metabolitów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i modulację odpowiedzi immunologicznej śluzówki układu pokarmowego (Magalhães i wsp., 2018).

W 2002 roku eksperci FAO i WHO przyjęli definicję probiotyków, uznając, że są to: „*żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej liczbie wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza*”. Mikroorganizmy, aby mogły zostać uznane za probiotyczne, powinny zostać zdefiniowane pod względem taksonomicznym i spełnić określone kryteria dotyczące bezpieczeństwa stosowania, cech funkcjonalnych oraz technologicznych. Kluczowe wymagania stawiane probiotykom to:

- 1) muszą być żywe w momencie podania do organizmu i muszą być mikroorganizmami;
- 2) muszą być podane w odpowiedniej dawce, ściśle związanej z dokumentacją kliniczną;
- 3) muszą wywierać korzystny wpływ na gospodarza (Sanders, 2014).

W 2014 r. eksperci ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) zorganizowali spotkanie, którego efektem była publikacja weryfikująca wcześniejszy Raport FAO/WHO (2002). Ogłoszono konsensus, który uwzględnił niewielkie poprawki gramatyczne do definicji, pozostawiając jej sens i znaczenie. Probiotykami można nazywać wiele rodzajów mikroorganizmów, które wykazują korzyści zdrowotne dla gospodarza, pozostając żywe. W zaprezentowanym dokumencie szczególnie podkreślono tę cechę i wykluczono z definicji „probiotyku” metabolity i martwe komórki mikroorganizmów. Dodatkowo uzgodniono, że „probiotykami” nie są niezdefiniowane konsorcja mikroorganizmów (jak np.

transplantaty mikrobioty kałowej) oraz żywność fermentowana zawierająca niezdefiniowane mikroorganizmy (np. kiszona kapusta) (Hill i wsp., 2014).

Ze względu na fakt, że probiotyki muszą wywierać korzystny wpływ na gospodarza, uważa się, że powinny pochodzić ze środowiska jelitowego zdrowego człowieka, a tym samym wykazywać oporność na enzymy trawienne, niskie pH, wysokie stężenie soli żółciowych (Guarner i wsp., 2005). Zaleca się także aby w preparatach probiotycznych wykorzystywać szczepy izolowane z populacji, w jakiej mają mieć później zastosowanie (Nowak i wsp., 2010). Jednakże wydaje się, że właśnie owa swoistość działania, a nie źródło izolacji drobnoustroju są istotne. Większość szczepów probiotycznych stosowanych u ludzi zostało wyizolowanych od człowieka, ale to zalecenie nie stanowi wymagania. Znanych jest także kilka dobrze przebadanych szczepów probiotycznych nie pochodzących od człowieka (np. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* i *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*). W rzeczywistości bardzo trudno jest potwierdzić źródło pochodzenia drobnoustroju (Sanders, 2014).

Izolacja, identyfikacja oraz ocena bezpieczeństwa i właściwości probiotycznych nowych szczepów mikroorganizmów jest praktyką potrzebną, szczególnie obecnie, gdy obserwuje się postępującą utratę bioróżnorodności ludzkich mikrobiomów (Blaser, 2016). Sprawnie działający ekosystem jelitowy, tzw. mikrobiom, ma duży wpływ na zachowanie zdrowia człowieka. Ze względu na rosnącą świadomość roli mikroflory jelitowej dla zachowania zdrowia człowieka, od ponad 20 lat, na całym świecie prowadzone są prace badawcze związane z możliwościami pozytywnej modyfikacji lub wzbogacenia mikrobiomu człowieka. Uważa się, że zastosowanie w żywieniu odpowiednio dobranych szczepów bakterii probiotycznych może korzystnie modulować skład mikrobioty jelit (Kerry i wsp., 2018).

Nowo izolowane i charakteryzowane szczepy bakterii mogą w dalszych etapach badań posłużyć do konstruowania innowacyjnych kultur starterowych dedykowanych do żywności. Nowe szczepionki oprócz właściwości ochronnych (bakteriostatycznych i bakteriobójczych) mogą wносить dodatkowe wartości związane z poprawą zdrowia konsumenta, poprzez modelowanie składu produktu, zwiększanie dostępności bioaktywnych składników, a także działanie probiotyczne. Co więcej, udowodniono, że składniki żywności, czyli odpowiednia matryca mogą stanowić ochronę dla bakterii i ułatwiają ich przeżywanie w trudnych warunkach panujących w przewodzie pokarmowym człowieka (Fontana i wsp., 2013, Neffe i wsp., 2018).

Zatem bakterie o potencjalnych cechach probiotycznych poza konwencjonalnym źródłem (przewód pokarmowy zdrowego człowieka), mogą pochodzić z niekonwencjonalnych źródeł takich jak przewód pokarmowy zwierząt, mleko kobyce, żywność (fermentowana i niefermentowana), powietrze czy gleba, co sugerują niektóre badania (Fontana i wsp., 2013; Ren i wsp., 2014; Vinderola i wsp., 2017). Zgodnie z obecnym stanem wiedzy mikroorganizmy probiotyczne powinny wykazywać efekt poprawy stanu zdrowia gospodarza. Pochodzenie mikroorganizmów z przewodu pokarmowego człowieka nie jest kryterium wskazywanym jako niezbędne, choć wiele źródeł podaje inaczej (Salminen i wsp., 1998; Collins i Gibson,

1999). Tym bardziej, że coraz więcej dowodów naukowych wskazuje na nowe niekonwencjonalne źródła izolacji jako właściwe. Co więcej, mikroorganizmy wyizolowane z żywności często wykazują lepszą przeżywalność w środowisku żywności i gwarantują bardziej atrakcyjne cechy sensoryczne w porównaniu z drobnoustrojami pochodzenia jelitowego (Fontana i wsp., 2013, Neffe i wsp., 2018).

Właściwości wielu szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych ze źródeł niekonwencjonalnych są zgodne z zaleceniami FAO/WHO dotyczącymi probiotyków, z wyjątkiem jednego – nie pochodzą z przewodu pokarmowego człowieka. W prowadzonych przeze mnie badaniach, przedstawionych jako osiągnięcie naukowe postawiłam podstawowe pytanie: czy wobec wielu nowych dowodów naukowych nie należy rozpatrzyć możliwości zmiany obecnych wymagań FAO/WHO dotyczących definicji bakterii probiotycznych i podkreślić znaczenie źródła izolacji?

Celem osiągnięcia będącego podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest charakterystyka wybranych właściwości funkcjonalnych i technologicznych bakterii *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności fermentowanej oraz ocena czy prezentowane właściwości pozwalają na zaklasyfikowanie szczepu do bakterii probiotycznych.

Zakres badań obejmował:

- Izolację, identyfikację i wstępną selekcję szczepów *Lactobacillus*, pod kątem bezpieczeństwa.
- Ocenę przeżywalności wybranych bakterii *Lactobacillus* w warunkach *in vitro* symulujących pasaż żołądkowo-jelitowy oraz analizę czynników determinujących oporność na te warunki.
- Analizę i ocenę wybranych właściwości probiotycznych *in vitro* wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus*.
- Ocenę możliwości zastosowania wybranych szczepów *Lactobacillus* w celu kształtowania jakości żywności funkcjonalnej.

Hipotezy badawcze:

1. Możliwe jest wyizolowanie bakterii fermentacji mlekowej z żywności tradycyjnie fermentowanej oraz wyselekcjonowanie szczepów bezpiecznych w przypadku stosowania u ludzi, wrażliwych na antybiotyki i nie wytwarzających niepożądanych enzymów.
2. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z żywności tradycyjnie fermentowanej są odporne na warunki panujące w modelowym przewodzie pokarmowym. Na przeżywalność bakterii probiotycznych w warunkach

symulujących środowisko żołądka ma wpływ rodzaj nośnika w postaci żywności, a także zastosowana dawka bakterii.

3. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z żywności tradycyjnie fermentowanej wykazują zdolność przylegania do komórek nabłonka jelitowego *in vitro* i właściwości immunoregulujące.
4. Możliwość zastosowania bakterii *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności tradycyjnie fermentowanej jako kultur starterowych do wytwarzania produktów funkcjonalnych jest zróżnicowana i uwarunkowana m.in. otrzymaniem produktów o akceptowanych cechach sensorycznych.

Wyniki i ich omówienie

*Izolacja, identyfikacja i wstępna selekcja szczepów *Lactobacillus*, pod kątem bezpieczeństwa*

W publikacjach H1 i H5 podjęłam problematykę izolacji, identyfikacji oraz bezpieczeństwa LAB pozyskanych z żywności fermentowanej.

Żywność fermentowana w sposób tradycyjny, którą stanowiły kiszone ogórki i kapusta, pochodzące z samodzielnych gospodarstw domowych, z różnych regionów Polski, były źródłem izolacji bakterii fermentacji mlekowej (H1). Z pobranych próbek wyizolowano łącznie 38 szczepów, z czego 17 zaklasyfikowano do rodzaju *Lactobacillus* sp. na podstawie wyglądu komórek pod mikroskopem, barwienia Grama, testu na obecność katalazy, a także wzrostu w temp. 10, 15 i 45°C i wzrostu w warunkach pH = 3,9 i 9,6. Dalsza identyfikacja polegała na izolacji bakteryjnego DNA, amplifikacji fragmentów 16S rDNA przy użyciu uniwersalnych starterów 27F/1492R (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'/5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') i poddaniu uzyskanych produktów PCR sekwencjonowaniu. Na podstawie uzyskanych sekwencji nukleotydów zidentyfikowano 14 szczepów badanych bakterii *Lactobacillus*, przyporządkowując je do gatunków: *casei*, *plantarum*, *brevis*, *rhamnosus*, *johnsonii*. Porównując analizy identyfikacji z użyciem metod genetycznych z identyfikacją z użyciem metod biochemicznych stwierdzono, że wyniki nie są zbieżne we wszystkich przypadkach. Według zaleceń FAO/WHO do pełnej identyfikacji konieczne jest sekwencjonowanie odcinków silnie zakonserwowanych genetycznie tj. 16S rDNA lub 23S rDNA. Właściwa identyfikacja bakterii, które mają być wykorzystywane jako probiotyki jest bardzo ważnym elementem, ponieważ cechy funkcjonalne bakterii są szczepozależne i nie można ich ekstrapolować na gatunek, czy rodzaj. **Stwierdziłam, że identyfikacja tylko przy użyciu metod biochemicznych jest niewystarczająca i może dawać mylne wyniki. Jednakże profil aktywności biochemicznej może być pomocny w identyfikacji korzystnych technologicznie enzymów produkowanych przez bakterie, jak np. β -galaktozydazę, lub wykluczyć mikroorganizmy produkujące szkodliwe enzymy, jak np. β -glukuronidaza, α -chymotrypsyna, β -glukozydaza, czy N-acetylo- β -glukozaminidaza.** Wspomniane szkodliwe enzymy mogą generować

potencjalnie rakotwórcze metabolity w okrężnicy (Heavey, Rowland, 2004). Na podstawie wykonanych doświadczeń, z puli badanych szczepów wykluczono trzy, które produkowały niepożądane enzymy.

Bezpieczeństwo stosowania probiotyków u ludzi wiąże się nie tylko z możliwością wytwarzania niepożądanych enzymów, ale także z problemem antybiotykooporności. W wyniku doświadczeń przeprowadzonych w ramach badań przedstawionych w publikacji H1 stwierdzono, że większość badanych szczepów *Lactobacillus*, wyizolowanych z żywności fermentowanej tradycyjnie jest wrażliwa na testosowane antybiotyki. Jedynie dwa szczepy z 14. badanych wykluczono z dalszych badań ze względu na oporność na tetracyklinę, która może być przekazywana za pomocą plazmidów, co wiąże się z ryzykiem narastania antybiotykooporności. Tę tezę należałoby jednak zweryfikować w dalszym toku badań. Zaproponowane i wykorzystane przeze mnie w publikacji H1 testy diagnostyczne *in vitro* pozwalają na szybką i tanią wstępną selekcję szczepów pod kątem bezpieczeństwa. **Ostatecznie w wyniku badań (H1) związanych z izolacją, identyfikacją i wstępną oceną bezpieczeństwa szczepów *Lactobacillus*, do dalszych badań nad identyfikacją i charakterystyką właściwości probiotycznych wytypowałam 10 szczepów: *Lb. casei* (O12, O13, O16, O18), *Lb. plantarum* (O19, O20), *Lb. brevis* (O22, O24), *Lb. rhamnosus* K3 i *Lb. johnsonii* K4.**

Wstępne wyniki badań zaprezentowane w publikacji H1 skłoniły mnie do pogłębienia wiedzy na temat różnych źródeł izolacji bakterii o właściwościach probiotycznych. W wyniku poszukiwań zauważyłam, że bakterie fermentacji mlekowej o cechach probiotycznych, izolowano z różnych źródeł konwencjonalnych (przewód pokarmowy zdrowego człowieka), a także niekonwencjonalnych, takich jak: przewód pokarmowy zwierząt, żywność fermentowana i niefermentowana, odpady żywnościowe, ścieki, gleba, czy powietrze. W publikacji H5 zebrano i przytoczono szereg przykładów badań nad właściwościami probiotycznymi, w tym przeciwdrobnoustrojowymi szczepów LAB wyizolowanych z konwencjonalnych, ale przede wszystkim niekonwencjonalnych źródeł. Inne, nie ujęte w niniejszym osiągnięciu naukowym prace własne, także zostały przytoczone jako przykłady. W publikacji H5 posiłkowałam się własnym doświadczeniem i obserwacjami, z których wynika, że szczepy bakterii izolowanych z żywności polskiej tj.: sery regionalne, ekologiczna serwatka, fermentowane warzywa i produkty mięsne, wykazują cechy probiotyczne. Analizując dane pochodzące z badań własnych zauważono, że właściwości przeciwdrobnoustrojowe są zależne i charakterystyczne dla źródła izolacji. Na przykład szczepy LAB wyizolowane z serów górskich „oscypek” charakteryzowały się silnymi właściwościami przeciw *Listeria monocytogenes*, z kolei szczepy LAB wyizolowane z serów korycińskich – właściwościami przeciw *E. coli* (H5).

Ważnym osiągnięciem i wnioskiem wynikającym z zaprezentowanych w publikacji H5 analiz jest wykazanie potrzeby izolacji i identyfikacji nowych szczepów LAB oraz ich charakterystyki pod kątem bezpieczeństwa i funkcjonalności. Szczepy pozyskane ze źródeł lokalnych, podane w wysokiej dawce mogłyby uzupełnić bioróżnorodność gatunkową w populacjach mikrobioty

przewodu pokarmowego człowieka, wpływać korzystnie na poprawę zdrowia i kondycji, a także znaleźć zastosowane jako naturalne biokonserwanty w produkcji żywności.

Na podstawie badań własnych zaprezentowanych w H1 oraz w oparciu o analizę literatury, której dokonano w publikacji H5 zweryfikowano pozytywnie pierwszą hipotezę, wykazując, że żywność fermentowana tradycyjna i regionalna jest bogatym źródłem bakterii fermentacji mlekowej, wśród których są szczepy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, bezpieczne do stosowania u ludzi.

Ocena przeżywalności wybranych bakterii *Lactobacillus* w warunkach *in vitro* symulujących pasaż żołądkowo-jelitowy oraz analiza czynników determinujących oporność na te warunki.

W publikacjach H1, H2, H3 i H5 podjęłam problematykę charakterystyki właściwości probiotycznych *in vitro* wybranych szczepów *Lactobacillus*. Badania *in vitro* pozwalają na wstępną selekcję szczepów kandydatów przed przystąpieniem do bardziej skomplikowanych i kosztownych badań *in vivo*. Dobrze zaplanowane i przeprowadzone badania *in vitro* mają duże przełożenie na efekty obserwowane u organizmów żywych.

W przypadku badań nad probiotykami problemem jest brak szczegółowych wytycznych dotyczących metodyki badań. Wytyczne zebrane w raporcie grupy roboczej FAO/WHO (2002) stawiane nowym szczepom probiotycznym obejmują między innymi: przeżywalność w warunkach kwasowości żołądka, oporność na działanie kwasów żółciowych, zdolność przylegania do śluzu i/lub ludzkich komórek nabłonkowych oraz linii komórkowych, działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii potencjalnie patogennych, zdolność do obniżania adhezji patogenów do powierzchni nabłonka, aktywność hydrolaz soli żółciowych. W publikacjach H1, H2 i H3 zaproponowałam metody badawcze *in vitro* zgodne z wytycznymi FAO/WHO (2002) i zaprezentowałam wyniki badań dotyczące szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych z kiszonych ogórków i kapusty oraz szczepów o udokumentowanych właściwościach probiotycznych.

W badaniach ujętych w publikacji H1 dziesięć wstępnie wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus* poddano ocenie oporności na warunki symulujące przewód pokarmowy człowieka. Uznano, że najtrudniejszymi barierami do pokonania przez bakterie w trakcie pasażu jest niskie pH panujące w żołądku i obecność soli kwasów żółciowych w jelicie cienkim. W ramach badań przeprowadzono dwa doświadczenia. W pierwszym, hodowle badanych szczepów *Lactobacillus* poddano 2 godzinnej inkubacji w środowisku o pH 1,5; 2,5 i 3,5 w temperaturze 37°C, w celu symulacji warunków panujących w żołądku w czasie trawienia. Wartość pH 1,5 odpowiada sytuacji w żołądku człowieka podczas trawienia pokarmu, gdy występuje nagromadzenie dużych ilości soków żołądkowych, z kolei wartość pH 3,5 reprezentuje środowisko przejściowe pomiędzy żołądkiem, a dwunastnicą (Traczyk, 1989). **W wyniku przeprowadzonych badań stwierdziłam, że w warunkach środowiska o pH 3,5 i 2,5 przeżywalność szczepów bakterii *Lactobacillus* wynosiła powyżej 90%, natomiast wartość pH 1,5**

spowodowała istotne obniżenie liczebności żywych komórek bakterii po 60 minutach inkubacji do 23-38%, a po 120 minutach nie obserwowano już wzrostu mikroorganizmów w posiewach.

W drugim doświadczeniu, hodowle *Lactobacillus* inkubowano na pożywce MRS z dodatkiem 0,2%, 2% i 4% soli kwasów żółciowych w temperaturze 37°C. Fizjologiczna koncentracja soli kwasów żółciowych, biorących udział w procesie trawienia w jelicie cienkim wynosi 0,3-0,6%. Stężenie soli kwasów żółciowych na poziomie 2% odpowiada sytuacji, gdy w jelitach znajduje się znaczna ilość treści pokarmowej. Uważa się, że oporność bakterii na wyższe stężenia soli kwasów żółciowych 2 i 4% stanowi o ich silnych właściwościach probiotycznych (Kurman, 1988). **W wyniku przeprowadzonego doświadczenia stwierdziłam, że wszystkie badane szczepy *Lactobacillus* tolerowały 0,2% stężenie soli kwasów żółciowych, natomiast 2 i 4% stężenie soli kwasów żółciowych było czynnikiem dyskryminacyjnym, dzięki któremu wykazano, że *Lb. brevis* O22 i *Lb. plantarum* K1 są odporne na te warunki.** Oporność bakterii na wysokie stężenie soli kwasów żółciowych może wynikać z aktywności enzymu hydrolazy soli kwasów żółciowych (BSH), wytwarzanego jako reakcja obronna przed toksycznym działaniem soli na komórkę LAB. BSH katalizuje hydrolizę sprzężonych z tauryną lub glicyną soli żółci do wolnych kwasów żółciowych i aminokwasów, obniżając ich zdolności emulgujące (Ziarno, 2005). Aktywność BSH bakterii fermentacji mlekowej jest nie tylko cechą szczepozależną, ale również powiązaną z pochodzeniem szczepu – najczęściej wykrywana jest wśród szczepów pochodzenia jelitowego, co potwierdzają badania własne (H1).

Dodatkowo, w celu uzupełnienia badań skринingowych określono tolerancję badanych szczepów *Lactobacillus* na 0,4% stężenie fenolu w środowisku. Fenole mogą powstawać w jelicie w wyniku deaminacji bakteryjnej niektórych aminokwasów aromatycznych i są uważane za potencjalne kancerogeny (Suskovic i wsp., 1997). Niektóre LAB wykazują tolerancję na fenole. Właściwości te są pożądane i poszukiwane.

Na podstawie przeprowadzonych badań (H1) stwierdziłam, że wyizolowane z produktów fermentowanych szczepy *Lactobacillus* charakteryzują się dobrą, porównywalną do szczepów referencyjnych, o udokumentowanych cechach probiotycznych, przeżywalnością w opisanych powyżej warunkach modelowych. Szczególnie dobrą opornością na modelowe warunki charakteryzowały się szczepy *Lb. johnsonii* K4 i *Lb. brevis* O22. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że badane szczepy *Lactobacillus* będą w stanie przetrwać pasaż żołądkowo-jelitowy i dotrzeć do okrężnicy, zachowując swoją żywotność. Jednakże, aby potwierdzić tę tezę należy przeprowadzić badania *in vivo*, u ludzi.

Dowodzi to słuszności tezy, która sugeruje, że bakterie zawarte w żywności stanowią źródło bakterii komensalnych lub przejściowo bytujących w ludzkim przewodzie pokarmowym. Izolacja potencjalnych probiotyków z przewodu pokarmowego nie jest więc jedynie słuszną koncepcją. Założenie, że bakterie wyizolowane z dolnego odcinka przewodu pokarmowego, bądź z kału przetrwały trawienie jest oczywiste, niemniej jednak, jak dowodzą badania własne zaprezentowane

w H1 i inne prace badawcze, zaprezentowane w H5, bakterie fermentacji mlekowej pochodzące z niekonwencjonalnych źródeł również są w stanie przetrwać w tak trudnych warunkach. Szczególnie pałeczki mlekowe z rodzaju *Lactobacillus*, które dobrze tolerują środowisko kwaśne i potrafią regulować wewnątrzkomórkowe pH wykazują wspomniane wyżej właściwości.

Testy *in vitro* dostarczają ważnych informacji o różnicach między gatunkami i szczepami i są ważnym narzędziem badawczym, szczególnie do szybkiego scriningu w kierunku aktywności probiotycznej. Metody badań z zastosowaniem modeli statycznych *in vitro*, wykorzystane w pracy (H1) nie dają jednak kompleksowych informacji o stanie bakterii podczas trawienia pokarmu. Na skuteczność działania probiotycznego bakterii wpływa wiele czynników, m.in. koncentracja początkowa bakterii w momencie podania, sposób podania (rola ochronna składników żywności), aktywność bakterii i ich właściwości. Aby określić wpływ wspomnianych czynników na przeżywalność bakterii probiotycznych w czasie trawienia pokarmu *in vitro* zastosowano innowacyjny model dynamiczny (DGM – ang. *dynamic gastric model*), a wyniki eksperymentów zaprezentowano w pracy H2.

DGM został opracowany w Institute of Food Research (Norwich, Wielka Brytania) i jest komputerowo sterowanym modelem *in vitro*, który symuluje zarówno biochemiczne, jak i mechaniczne aspekty trawienia w żołądku w czasie rzeczywistym (Thuenemann i wsp., 2015). Z modelu DGM korzystałam będąc na stażu naukowym w Danii, na Uniwersytecie w Kopenhadze, gdzie przeprowadziłam doświadczenia, których celem było określenie wpływu matrycy (czekolada mleczna a czekolada gorzka 72%) na przeżywalność szczepów bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* NCFM® i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (HOWARU™, Danisco USA Inc., USA). W wyniku trawienia probiotycznej czekolady w modelu DGM stwierdzono, że populacja *B. lactis* HN019 nie zmieniła się istotnie, niezależnie od zastosowanej matrycy, natomiast liczebność *Lb. acidophilus* NCFM® w obu próbkach czekolady znacznie się obniżyła, najprawdopodobniej z powodu negatywnego wpływu środowiska modelu, gdzie pod koniec trawienia wartość pH wyniosła poniżej 3,0.

Porównując wyniki doświadczenia z zastosowaniem DGM z klasycznym modelem statycznym (H2), stwierdzono podobne tendencje przeżywalności bakterii. Zauważono także wpływ koncentracji zastosowanych bakterii na ich przeżywalność w czasie trawienia w modelu statycznym. Stwierdzono, że dawka 10^8 jtk/g jest niewystarczająca do zapewnienia odpowiedniego poziomu przeżywalności bakterii w czasie procesu trawienia. Komórki bakterii mają zdolności do buforowania środowiska, co w dużej koncentracji może zwiększać ich szanse przeżycia (Mortensen i wsp., 2006).

W celu porównania wpływu innych matryc żywnościowych na przeżywalność bakterii probiotycznych, trawieniu w modelu DGM poddano także wybrane komercyjnie dostępne produkty probiotyczne: Actimel™ napój jogurtowy, jogurt Gut & Günstig i Pro Viva - sok owocowy i porównano z badanymi czekoladami (H2). **Zauważono, że przeżywalność bakterii probiotycznych podczas 65 minut trawienia jest zróżnicowana i zależna od nośnika żywnościowego. Najlepszym medium okazała się**

czekolada, która zawiera proporcjonalnie więcej tłuszczu, działającego ochronnie na komórki bakterii, w porównaniu z pozostałymi badanymi nośnikami. Pomimo tego, że zawartość tłuszczu w gorzkiej czekoladzie jest o 10% wyższa niż w czekoladzie mlecznej, przeżywalność bakterii probiotycznych była nieco wyższa w przypadku czekolady mlecznej. Może to wskazywać na efekt synergistyczny tłuszczu i białka, którego zawartość była z kolei większa w przypadku czekolady mlecznej. Wydaje się, że duża zdolność buforowa nośnika w postaci czekolady mlecznej może chronić bakterie probiotyczne przed stresem związanym z niskim pH panującym w żołądku (Lahtinen i wsp, 2007). W przypadku tego medium żywnościowego liczebność bakterii utrzymywała się na wysokim poziomie $> 10^9$ jtk/g, podczas gdy w produktach mlecznych populacja bakterii probiotycznych już po 10-15 minutach trawienia *in vitro* obniżyła się do poziomu granicy detekcji i utrzymywała się poniżej tego poziomu do końca procesu trawienia. Również liczebność *Lb. plantarum* 299v – szczepu probiotycznego, który był składnikiem soku owocowego obniżyła się istotnie (o około 4 rzędy logarytmiczne) podczas pierwszych 5 minut trawienia i utrzymywała się na niskim poziomie (około 10^3 jtk/g) do końca procesu trawienia.

W wyniku badań zaprezentowanych w publikacji H2 zweryfikowałam pozytywnie hipotezę 2., wykazując, że wybrane szczepy bakterii *Lactobacillus* wyizolowane ze spontanicznie kiszonych warzyw mogą przetrwać w trudnych, modelowych warunkach panujących w żołądku i jelicie, co sugeruje, że mogą dotrzeć do okrężnicy. Udowodniłam także, że medium w postaci żywności jest ważnym czynnikiem warunkującym przeżywalność bakterii probiotycznych podczas trawienia w modelach *in vitro* przewodu pokarmowego człowieka, a koncentracja początkowa bakterii w żywności wpływa na ich przeżywalność w trakcie procesu trawienia. Zatem, dobór odpowiedniego nośnika żywnościowego i odpowiedniej dawki bakterii probiotycznych ma kluczowe znaczenie w projektowaniu żywności funkcjonalnej, ponieważ determinuje przeżywalność bakterii podczas trawienia i tym samym możliwość wywołania efektu terapeutycznego.

Analiza i ocena wybranych właściwości probiotycznych in vitro wyselekcjonowanych szczepów *Lactobacillus*

W kolejnej pracy (H3) 10 szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności fermentowanej i wyselekcjonowanych w wyniku prac badawczych przedstawionych w pracy H1, spełniających wstępne kryteria zawarte w zaleceniach FAO/WHO (2002), poddano ocenie odnośnie zdolności do adhezji do enterocytów linii Caco-2, zdolności do regulacji produkcji cytokin przez makrofagi oraz zbadano wpływ bezpośredniego działania komórek *Lactobacillus* na apoptozę enterocytów.

Stwierdzono, że zdolność przylegania komórek badanych szczepów *Lactobacillus* do enterocytów linii komórkowej Caco-2 jest porównywalna ze zdolnością komórek szczepów probiotycznych (*Lb. plantarum* 299v i *Lb. rhamnosus* GG), wyizolowanych z przewodu pokarmowego człowieka (H3). Co więcej sześć z badanych szczepów (O12,

O16, O18, O22, O24 and K3) wykazywało większą zdolność do adhezji niż szczepy referencyjne. Zdolność *Lactobacillus* do przylegania tłumaczy się właściwościami hydrofobowymi tych komórek, które uważa się za pośrednią miarę zdolności bakterii do adhezji. Hydrofobowa powierzchnia ścian komórkowych bakterii pozwala na zwiększenie interakcji z powierzchnią śluzu wydzielanego przez enterocyty. W badaniach własnych (H1) stwierdzono zróżnicowaną hydrofobowość bakterii BATH (24,7% - 73,4%) wyrażoną jako stopień powinowactwa do ksylenu. Jednakże, nie stwierdzono korelacji pomiędzy stopniem hydrofobowości ścian komórkowych bakterii, a zdolnością do adhezji do enterocytów (H3). Wydaje się, że za zdolność przylegania bakterii do powierzchni odpowiada wiele czynników, wśród których hydrofobowość ścian komórkowych nie jest czynnikiem kluczowym. Elementami, które wpływają na zdolność komórek bakterii *Lactobacillus* do adhezji są, poza czynnikami środowiskowymi, czynniki białkowe, zwane adhezynami oraz czynniki niebiałkowe, takie jak kwasy lipotejchojowe i egzopolisacharydy (EPS). Sugeruje się, że EPS mogą także wpływać na zdolność tworzenia agregatów i biofilmów. Czynniki te (zarówno białkowe, jak i niebiałkowe) są ściśle związane z powierzchnią ściany komórkowej (Paliwoda i Nowak, 2017).

W dalszej pracy badawczej planuję rozwinąć temat zdolności komórek *Lactobacillus* do adhezji. W projekcie Miniatura 1 (nr 2017/01/X/NZ9/01627), którego byłam kierownikiem badałam wpływ uszkodzenia termicznego komórek *Lactobacillus* na zdolność do adhezji. Celem badań była ilościowo – jakościowa ocena porównawcza zdolności komórek *Lactobacillus* do adhezji i agregacji w zależności od ich postaci (żywe komórki i martwe), a także wstępna identyfikacja substancji odpowiedzialnych za spodziewany efekt. Wyniki tych eksperymentów są obiecujące i sugerują, że uszkodzone komórki bakterii także wykazują zdolności do przylegania i wiązania śluzu jelitowego.

Uważa się, że wybór odpowiedniego szczepu probiotycznego do stosowania w żywności lub w preparatach probiotycznych, powinien opierać się na jego zdolności do poprawy odpowiedzi immunologicznej w jelitach (Galdeano i wsp., 2007, Dong i wsp., 2010). W publikacji H3 zbadano *in vitro* wpływ dodatku szczepów *Lactobacillus* na regulację sekrecji wybranych cytokin (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-23 i TNF- α) przez makrofagi. **Wyniki przeprowadzonych doświadczeń sugerują, że badane szczepy *Lactobacillus* nie stymulują produkcji cytokin pro-zapalnych (IL-1 β , IL-6, IL-23 i TNF- α) przez makrofagi indukowane LPS (lipopolisacharydem pochodzącym ze ściany komórkowej *E. coli*), a wręcz mogą hamować ich sekrecję (np. IL-6 i IL-23).** Należy nadmienić, że IL-6 ma zarówno właściwości pro-, jak i przeciw-zapalne. Odgrywa ważną rolę w rozpoznawaniu początkowej reakcji zapalnej. Obecność IL-6 może pomóc w przekształceniu wrodzonej odpowiedzi na bardziej specyficzną i utrzymującą się odpowiedź adaptacyjną na patogeny (Gabay, 2006). Odpowiedź immunologiczna makrofagów indukowanych samymi komórkami badanych szczepów *Lactobacillus* była około 100-krotnie niższa, w porównaniu ze stymulacją przez LPS, co świadczy o niskim stopniu stymulacji odpowiedzi zapalnej przez same bakterie *Lactobacillus*. **Co więcej, większość badanych szczepów stymulowała produkcję przeciw-zapalnej IL-10, przy czym w największym stopniu szczepy: *Lb. plantarum***

O20, a także *Lb. brevis* O22 i O24 (H3), zjawisko to nie było zależne od stymulacji LPS. Zaprezentowane wyniki badań świadczą o dużym potencjale badanych szczepów *Lactobacillus* do immunomodulacji.

Kolejne przeprowadzone doświadczenie (H3) polegało na ocenie wpływu żywych komórek badanych szczepów *Lactobacillus* na apoptozę enterocytów. Apoptoza to zaplanowana śmierć komórki, dzięki której kontrolowana jest liczba komórek w tkankach, a także eliminowane są pojedyncze, np. zmutowane komórki. Jednak nieplanowana apoptoza niektórych komórek może być szkodliwa (Howarth i Wang, 2013). W badaniu (H3) wykazano, że apoptozie indukowanej przez *Lactobacillus* towarzyszyły zmiany aktywności kaspazy-3, która jest jednym z pierwszych sygnałów rozpoczęcia w komórce tego procesu. Wykazano, że komórki *Lactobacillus* mogą nieznacznie indukować apoptozę w komórkach Caco-2. Szczepem o najsilniejszych właściwościach stymulacji apoptozy był *Lb. casei* O18.

Z drugiej strony, badane szczepy *Lactobacillus* nie zwiększały apoptozy indukowanej chemicznie (przez staurosporynę - STS), a ponadto siedem z nich (*Lb. casei* O16 i O18, *Lb. plantarum* O19, O20, *Lb. brevis* O22, *Lb. rhamnosus* K3i *Lb. johnsonii* K4) obniżyły aktywność kaspazy-3 po stymulacji STS, ale zmiany te nie były istotne statystycznie. Reasumując, wykazano, że badane szczepy *Lactobacillus* mają zdolność indukowania apoptozy, ale jednocześnie nie potęgują apoptozy indukowanej chemicznie, co może mieć konsekwencje i zastosowanie w regulacji procesów życiowych komórek. Niewątpliwie, lepsze zrozumienie interakcji jelitowych może przyspieszyć opracowywanie nowych szczepów terapeutycznych do stosowania u ludzi.

W badaniach własnych zaprezentowanych w H1 i H3 wykazałam, że dzięki udowodnionej *in vitro* oporności na warunki panujące w przewodzie pokarmowym i zdolności do adhezji badane szczepy *Lactobacillus* wyizolowane z żywności fermentowanej tradycyjnie najprawdopodobniej będą w stanie skolonizować nabłonek jelita i wywołać efekt immunomodulacji, co pozytywnie weryfikuje hipotezę 3.

Ze względu na to, że przeprowadzone doświadczenia w pracach H1, H2 i H3 były badaniami *in vitro*, wnioski płynące z nich są warunkowe, ponieważ nie zawsze badania *in vitro* przekładają się na efekt *in vivo* w organizmie człowieka. Niewątpliwie słabą stroną większości prac opisujących właściwości probiotyczne szczepów wyizolowanych z różnych niekonwencjonalnych źródeł, są dowody zebrane tylko na podstawie badań *in vitro*, co zostało zauważone w publikacji H5. Na podstawie zestawienia 60. oryginalnych prac badawczych z ostatnich lat stwierdzono, że tylko nieliczne badania prowadzono na zwierzętach doświadczalnych, a jeszcze mniej eksperymentów przeprowadzono z udziałem ludzi. Należy podkreślić, że badania *in vivo* są bardziej kosztowne i czasochłonne, dlatego tym większą rolę odgrywa wstępna skuteczna selekcja szczepów kandydatów do dalszych badań w kierunku zdefiniowania efektu probiotycznego (H5).

W pracach H1, H2 i H3 zaproponowałam zestaw i sekwencję serii badań *in vitro* nowych izolatów bakterii, o dużej mocy dyskryminacyjnej, a zarazem prostych i tanich.

Testy takie mogą pozwolić na wstępną, szybką selekcję szczepów, przed przystąpieniem do badań *in vivo*, co stanowi zarówno wartość naukową jak i aplikacyjną.

Ocena możliwości zastosowania wybranych szczepów *Lactobacillus* w celu kształtowania jakości żywności funkcjonalnej

Niewątpliwą zaletą szczepów LAB pochodzących z żywności jest ich zdolność do wzrostu i podejmowania aktywności metabolicznej właśnie w tych produktach. Właściwości technologiczne, które są pożądane z punktu widzenia producenta i konsumenta to: łatwość produkcji dużej ilości biomasy, wysoka produktywność hodowli, oporność na bakteriofagi, genetyczna stabilność, oporność na procedury utrwalania starterów (zamrażanie, liofilizacja, przechowywanie), żywotność i stabilność pożądanych cech bakterii w czasie przygotowania i dystrybucji produktów probiotycznych, wysoka przeżywalność przechowalnicza bakterii w gotowym produkcie, a także zapewnienie pożądanych cech sensorycznych gotowych produktów (Nowak i wsp., 2010).

Mleko kozie ma cenne walory odżywcze, ale jednocześnie jest trudnym surowcem, ze względu na mało atrakcyjne, a dla niektórych nieakceptowane cechy sensoryczne, które w znacznym stopniu determinują wybory konsumentów. Rozwiązaniem, które zwiększa atrakcyjność tego produktu może być fermentacja. Zauważono, że fermentowane napoje z mleka koziego charakteryzują się wysoką wartością biologiczną i strawnością białek, a także zadowalającymi cechami sensorycznymi (García i wsp., 2014). Podążając za tym trendem w technologii żywności postanowiono zastosować bakterie probiotyczne i potencjalnie probiotyczne do fermentacji tego surowca, w celu dodania nowej wartości funkcjonalnej (prozdrowotnej).

W pracy badawczej przedstawionej w publikacji H4 podjęto próbę zastosowania wyselekcjonowanych we wcześniejszych badaniach H1 i H3, potencjalnie probiotycznych szczepów *Lb. rhamnosus* K3 i *Lb. plantarum* O20 do wytworzenia fermentowanych napojów z mleka koziego. W celach porównawczych zastosowano także dwa szczepy probiotyczne dostępne komercyjnie *Lb. acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, pochodzące z kolekcji Chr. Hansena. Badane szczepy zastosowano jako monokultury startowe, prowadząc proces fermentacji mleka metodą zbiornikową w temperaturze 37 °C do momentu ukwaszenia (pH 4,5-4,8). Tak przygotowane napoje poddano ocenie jakości mikrobiologicznej i sensorycznej w czasie 0, 3, 7, 10 i 14 dni przechowywania w temperaturze 4°C.

W wyniku przeprowadzonych badań (H4) stwierdzono, że początkowa liczba komórek wprowadzonych szczepów bakterii była wysoka (powyżej 10^8 jtk/ml) i utrzymywała się na tym poziomie przez cały okres przechowywania. Za najbardziej pożądaną według kryterium smaku oceniający uznali próbę mleka koziego fermentowanego szczepem *Lb. plantarum* O20. Napój fermentowany z użyciem szczepu *Lb. plantarum* O20 cechował się najwyższymi notami jakości ogólnej, a także zapachem i smakiem mleczno – fermentacyjnym i gładkością. Dodatkowo fermentacja z udziałem

tego szczepu zamaskowała smak i zapach „kozi” – typowy dla mleka koziego. Napój fermentowany z użyciem szczepu *Lb. rhamnosus* K3 cechował się średnimi notami jakości ogólnej, na które miały wpływ wysokie noty smaku kwaśnego oraz niezbyt wysokie noty gładkości. Najgorzej oceniono napój fermentowany z użyciem szczepu *Lb. acidophilus* La-5, który charakteryzował się także największą intensywnością not smaku kwaśnego, a także dość intensywnym smakiem gorzkim, drażniącym i „kozim”. Z kolei napój fermentowany z użyciem szczepu *Bifidobacterium animalis* BB12 cechował się łagodnym smakiem i zapachem, nietypowym dla mlecznych napojów fermentowanych. Istotnie wyższa intensywność smaku słodkiego i niższa smaku kwaśnego i mleczno – fermentacyjnego, w porównaniu z pozostałymi wariantami prób napojów, sprawiła, że pożądalność tego napoju była umiarkowana.

Na podstawie badań własnych zaprezentowanych w publikacji H4 można stwierdzić, że zastosowanie różnych szczepów bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych do fermentacji mleka koziego w znacznym stopniu determinuje jakość sensoryczną. Przydatność technologiczna bakterii zastosowanych w badaniu była zróżnicowana, przy czym jakość sensoryczna napojów wytworzonych z udziałem szczepu *Lb. plantarum* O20, który wyizolowano z kiszonych ogórków była najlepsza.

Udowodniłam tym samym, że istnieje możliwość wyprodukowania funkcjonalnych fermentowanych napojów z mleka koziego, o odpowiednio dużej dawce żywych komórek bakterii w 1 g produktu, co pozwala na uznanie tej żywności za funkcjonalną. Stwierdziłam, że przydatność technologiczna szczepów była zróżnicowana i zależna od jakości sensorycznej uzyskanych napojów, weryfikując pozytywnie hipotezę 4.

Szczepy bakterii *Lactobacillus* wyizolowane i scharakteryzowane przeze mnie w zaprezentowanych publikacjach H1, H3 i H4 znalazły także zastosowanie w pracach innych autorów (Sionek i wsp., 2015; Sionek i wsp., 2016; Trząskowski wsp., 2018) oraz własnych (Szydłowska i wsp., 2017). Udowodniono, że wybrane szczepy bakterii *Lactobacillus* wyizolowane z żywności fermentowanej w sposób tradycyjny mogą znaleźć zastosowanie w projektowaniu żywności funkcjonalnej (soki warzywne, napoje miodowe, sorbety z dyni). Nowe szczepy bakterii o cechach potencjalnie probiotycznych są zdeponowane w wewnętrznej kolekcji Zakładu Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Podsumowanie

Przedstawiony jako osiągnięcie cykl publikacji stanowi wieloetapowe badanie podejmujące problem pozyskiwania szczepów probiotycznych do stosowania u ludzi. W przedstawionym osiągnięciu scharakteryzowałam cechy funkcjonalne i oceniłam przydatność technologiczną szczepów bakterii *Lactobacillus*, które wyizolowałam z żywności fermentowanej w sposób tradycyjny.

W wyniku przeprowadzonych badań własnych, a także w oparciu o analizę prac badawczych opublikowanych w literaturze przedmiotu w ostatnich latach, **udowodniłam, że żywność jest dobrym źródłem izolacji bakterii o cechach probiotycznych, a ponadto wybrane szczepy bakterii charakteryzują się lepszą przydatnością do projektowania żywności funkcjonalnej o atrakcyjnych cechach sensorycznych, w porównaniu do izolatów z przewodu pokarmowego człowieka, co uważam za najważniejsze osiągnięcie w swojej dotychczasowej pracy naukowo-badawczej.** Dodatkowym osiągnięciem jest **zapropozowanie zestawu kompleksowych badań *in vitro*, służących wytypowaniu szczepów kandydatów do dalszych badań *in vivo*. Zapropozowana sekwencja szybkich testów *in vitro* pozwala na wyselekcjonowanie szczepów bakterii bezpiecznych, opornych na niskie pH środowiska i wysokie stężenie soli kwasów żółciowych, a także wykazujących zdolność adhezji do enterocytów i potencjał immunoregulujący.**

Uzyskane wyniki badań dostarczają dowodów i wiedzy na temat aktywności probiotycznej bakterii *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności, co przekłada się na ich prozdrowotne działanie w organizmie człowieka i predysponuje do dalszych badań w kierunku zdefiniowania efektu prozdrowotnego *in vivo*. Prezentowane w moim osiągnięciu badania mają także istotny charakter aplikacyjny. Badane bakterie *Lactobacillus* mogą znaleźć zastosowanie jak kultury startowe do produkcji żywności funkcjonalnej.

Za najcenniejsze osiągnięcie wynikające z przedstawionych do oceny badań uważam:

- Wykazanie, że żywność fermentowana w sposób tradycyjny jest dobrym źródłem izolacji bakterii o właściwościach definiowanych jako probiotyczne, które są porównywalne ze szczepami o udokumentowanych właściwościach probiotycznych, izolowanymi z przewodu pokarmowego człowieka.
- Optymalizację i zaproponowanie zestawu i sekwencji metod pracy badawczej *in vitro*, których celem jest szybki i o odpowiedniej mocy dyskryminacyjnej skryning bakterii pod względem ich cech probiotycznych.
- Wykazanie, że dobór odpowiedniego nośnika żywnościowego i odpowiedniej dawki bakterii probiotycznych ma kluczowe znaczenie w projektowaniu żywności funkcjonalnej, ponieważ determinuje przeżywalność bakterii podczas trawienia *in vitro* i w konsekwencji możliwość wywołania efektu terapeutycznego.
- Wykazanie, że wybrane szczepy bakterii *Lactobacillus* wyizolowane z żywności są bezpieczne do stosowania u ludzi i mogą przetrwać w warunkach symulujących przewód pokarmowy, wykazują zjawisko adhezji do komórek nabłonka jelitowego *in vitro* i działanie immunoregulujące.
- Wykazanie, że wybrane szczepy bakterii *Lactobacillus* wyizolowane z żywności mogą być zastosowane do wytwarzania żywności o cechach funkcjonalnych ze

względem na lepszą przydatność technologiczną, rozumianą jako otrzymanie produktu o pożądanym cechach sensorycznych, w porównaniu ze szczepami o udokumentowanych cechach probiotycznych.

Literatura

- Blaser, M. J. (2016). Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science*, 352(6285), 544-545.
- Collins, M. D., & Gibson, G. R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American journal of clinical nutrition*, 69(5), 1052s-1057s.
- Dong, H., et al. "Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production." *Clinical & Experimental Immunology* 161.2 (2010): 378-388.
- FAO/WHO. (2002). „Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation”. *FAO. Food and Nutrition Paper 85* : 1-56.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British journal of nutrition*, 109(S2), 35-50.
- Gabay C (2006) Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 8(2):3.
- Galdeano CM, De LeBlanc AD, Vinderola G, Bonet AEB, Perdigon G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14:485–92.
- García V, Rovira S, Boutoia K and López M B (2014) Improvements in goat milk quality: A review. *Small Ruminant Research* 121(1) 51-57.
- Guarner F., Perdigon G., Corthier G., Salminen S., Koletzko B., Morelli L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic?. *British Journal of Nutrition*, 93(6), 783-786.
- Heavey, P.M.; Rowland, I.R. Gastrointestinal cancer. *Best Pract. Res. Cl. Ga.* 2004, 18(2), 323-336.
- Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., ... & Calder P.C. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506.
- Howarth GS, Wang H (2013) Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients* 5(1):58-81.
- Kerry R.G.; Patra J.K., Gouda S., Park Y., Shin H-S., Das G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*
- Kurman J.A.: Starters with selected intestinal bacteria. *Bulletin IDF* 227, 41–55 (1988)
- Lahtinen S., Ouwehand A., Salminen S., Forssell P., Myllarinen P. (2007). Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 500-505.
- Magalhães, A. J., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*.
- Mortensen H., Gori K., Siegmundfeldt H., Nissen P., Jespersen L., Arneborg N. (2006). Intracellular pH homeostasis plays a role in the NaCl tolerance of *Debaryomyces hansenii* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 713-719.
- Neffe-Skocińska, K., Rzepkowska, A., Szydłowska, A., & Kołożyn-Krajewska, D. (2018). Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. In *Alternative and Replacement Foods* (pp. 65-94).
- Nowak A., Slizewska K., Libudzisz Z. (2010). Probiotyki-historia i mechanizmy działania. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 17(4), 5-19.
- Paliwoda, A., & Nowak, A. (2017). Czynniki warunkujące zdolności adhezyjne bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Postępy Mikrobiologii*, 56(2).
- Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Du, S., Ye, F., ... & Sun, Y. (2014). In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, 30, 1-10.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., ... & Birkeland, S. E. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *International journal of food microbiology*, 44(1-2), 93-106.
- Sanders M.E. (2014). Probiotics: the Concept, w: WGO Handbook on Gut Microbes, World Digestive Health Day, May 29, 2014, The WGO Foundation, Milwaukee, USA, 39-42.
- Sionek, B., Kołożyn-Krajewska, D., Gawarska, H., & Postupolski, J. (2016). Przydatność technologiczna szczepu *Lactobacillus rhamnosus* K4 do produkcji probiotycznego soku warzywnego. *Żywność: nauka-technologia-jakość*, (2 (105)), 95-105.
- Sionek, B., Kołożyn-Krajewska, D., Jaworska, D., & Blazejczyk, M. (2015). Zastosowanie bakterii kwasu mlekowego do produkcji probiotycznego soku warzywnego. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 22(4).

- Suskovic J, Brkic B, Matosic S, Maric V (1997) *Lactobacillus acidophilus* M 92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft* 52:430–435
- Szydłowska, A., & Zielińska, D. (2017). Wpływ dodatku przyprawy z suszonej kory cynamonowca na przeżywalność potencjalnie probiotycznych szczepów bakterii w musach dyniowo-jabłkowych i ich jakość sensoryczną. *Żywność: nauka-technologia-jakość*, (4 (113)), 48-58.
- Thuenemann, E. C., Mandalari, G., Rich, G. T., & Faulks, R. M. (2015). Dynamic gastric model (DGM). In *The impact of food bioactives on health* (pp. 47-59). Springer, Cham.
- Traczyk W. (1989): Fizjologia człowieka w zarysie. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, s. 330-346.
- Trzaskowska, M., Trzcińska, A., & Kapica, Ż. (2018). Jakość sensoryczna i przeżywalność potencjalnie probiotycznych szczepów *Lactobacillus* w fermentowanym napoju miodowym. *Żywność: nauka-technologia-jakość*, (1 (114)), 87-96.
- Vinderola, G., Gueimonde, M., Gomez-Gallego, C., Delfederico, L., & Salminen, S. (2017). Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. *Trends in food science & technology*, 68, 83-90.
- Ziarno M.: Znaczenie aktywności hydrolazy soli żółci u bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. *Biotechnologia*, 2005, 2 (69), 183-195.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Przed doktoratem

Badania do pracy magisterskiej w 2002 r. wykonałam w Katedrze Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności pod kierunkiem naukowym dr Małgorzaty Jałosińskiej. W badaniach tych zajmowałam się oceną przeżywalności bakterii probiotycznych w zaprojektowanym napoju marchwiowym. Pozytywne wyniki badań, a także chęć zgłębiania wiedzy dotyczącej zastosowania probiotyków w żywności skłoniły mnie do podjęcia studiów doktoranckich, na które zostałam przyjęta w 2003 r. Badania do pracy doktorskiej prowadziłam w tej samej Katedrze pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej, późniejszej promotor mojej pracy doktorskiej. Celem pracy było zaprojektowanie napoju sojowego fermentowanego szczepem bakterii probiotycznych oraz skonstruowanie matematycznych modeli prognozujących przeżywalność tych bakterii w produkcie w różnych warunkach. W wyniku badań zaprojektowano probiotyczny napój sojowy o akceptowalnych cechach sensorycznych i odpowiednio licznej populacji bakterii dodanych (*Zal.4 II.D.1 i II.D.2 oraz III.B.1, III.B.2*). Następnie dobrano odpowiednie warunki dojrzewania i przechowywania napoju oraz oceniono przeżywalność bakterii w zaprojektowanym napoju (*Zal.4 II.D.3 oraz III.B.3, III.B.4, III.B.5*). Kolejny etap badań polegał na wykorzystaniu danych eksperymentalnych do skonstruowania prognostycznych modeli wzrostu i przeżywalności bakterii probiotycznych w napoju sojowym (*Zal.4 II.D.4 oraz III.B.6*). Dnia 17 grudnia 2008 r. odbyła się publiczna obrona mojej pracy doktorskiej pt.: „*Prognostyczne modele przeżywalności bakterii probiotycznych w fermentowanym napoju sojowym*” na posiedzeniu Rady Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie, gdzie otrzymałam stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, a moja rozprawa doktorska została wyróżniona.

Efektami prac podjętych w trakcie doktoratu były publikacje (*Zał.4 II.A.3, II.D.9, II.D.15*), doniesienie konferencyjne (*Zał.4 III.B.7*), zgłoszenie patentowe (*Zał.4 II.B.1*), a także wdrożenie, polegające na umieszczeniu skonstruowanych modeli w Prognostycznej Bazie Danej (*Zał.4 III.A.2*), która jest udostępniona nieodpłatnie do celów szkoleniowych i wykorzystania w przemyśle (<http://prognostycznabazadanych.sggw.pl/>). Efekty te zostały opublikowane już po doktoracie, o czym będzie mowa poniżej.

Po doktoracie

W grudniu 2008 r. zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie, a następnie od 2010 r. do dziś pracuję na stanowisku adiunkta. Po obronie pracy doktorskiej podjęłam aktywność naukowo-badawczą w wielu obszarach, wśród których można wyróżnić następujące grupy tematyczne:

- Izolacja, identyfikacja i genotypowanie bakterii fermentacji mlekowej;
- Bezpieczeństwo stosowania bakterii fermentacji mlekowej, ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe i oporność na warunki symulujące pasaż żołądkowo-jelitowy;
- Technologiczne wykorzystanie bakterii probiotycznych;
- Modelowanie matematyczne i jakość mikrobiologiczna żywności.

5.1. Izolacja, identyfikacja i genotypowanie bakterii fermentacji mlekowej

W latach 2011-2013 brałam udział w projekcie badawczym Programu Wykonawczego z Instytutem Mikrobiologii Białoruskiej Akademii Nauk, Republiki Białorusi nt.: „*Próba izolacji i charakterystyka bakterii probiotycznych oraz zastosowanie w wybranych produktach żywnościowych*” w charakterze głównego wykonawcy ze strony SGGW. W ramach tego projektu podjęłam pierwsze próby izolacji i wstępnej identyfikacji fenotypowej bakterii fermentacji mlekowej z żywności. Badania zaowocowały doniesieniami na konferencje (*Zał.4 III.10 i III.13*), a także skłoniły mnie do kontynuacji prac nad izolacją, identyfikacją i charakterystyką bakterii. Efektem prac tego projektu było także wykorzystanie bakterii probiotycznych w projektowaniu żywności funkcjonalnej, co zostanie omówione w podrozdziale 5.3.

Następnie uzyskałam finansowanie jako kierownik zadania badawczego w ramach wewnętrznego trybu konkursowego na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, SGGW w Warszawie, dla młodego pracownika nauki w trzech kolejnych latach: w 2012 r. nt.: „*Badania in vitro wybranych właściwości probiotycznych bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych z tradycyjnej żywności fermentowanej*”, w 2013 r. nt.: „*Przydatność biotechnologiczna bakterii kwasu mlekowego o właściwościach potencjalnie probiotycznych (kontynuacja badań)*” i w 2014 r. nt.: „*Genotypowanie bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych z żywności*”.

W 2013 r. odbyłam także staż naukowy w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, SGGW pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Z. Przybeckiego, gdzie uczestnicząc w projekcie „*Podstawy metodyczne transformacji ogórka (*Cucumis sativus* L.) wysokocząsteczkowym DNA*” zdobyłam cenną wiedzę i umiejętności z zakresu genetyki i biologii molekularnej. Wynikiem tej współpracy była także publikacja dotycząca nowych metod biologii molekularnej oraz technik sekwencjonowania nowej generacji, w przygotowaniu której miałam zaszczyt uczestniczyć (Załącznik 4 II.A.4). Dzięki zdobytemu doświadczeniu w laboratorium biologii molekularnej, byłam w stanie zorganizować własny warsztat pracy i rozpocząć prace nad genotypowaniem bakterii fermentacji mlekowej, które wyizolowałam z żywności.

Efektom realizacji projektów, a także własnych prac badawczych jest liczna kolekcja nowych szczepów bakterii, wśród których jak dotąd 78 zostało zidentyfikowanych genetycznie, a ich sekwencje nukleotydów są opublikowane w bazie GenBank NCBI (Załącznik 4 II.E.1-4). Źródłem izolacji szczepów bakterii fermentacji mlekowej była żywność wytwarzana w sposób tradycyjny tj.: ekologiczne wędliny surowo dojrzewające (Załącznik 4 II.A.7, II.D.18 i III.B.26), sery regionalne oscypek i koryciński (Załącznik 4 II.A.5), ekologiczna serwatka kwasowa (Załącznik 4 II.A.6) oraz kiszzone ogórki i kapusta, które omówiono w osiągnięciu powyżej (Załącznik 4 I.B.1). Kolekcja nowych szczepów, zdeponowana w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji została zaprezentowana w publikacji w czasopiśmie branżowym *Przemysł Spożywczy* (Załącznik 4 II.D.12). Szczepy te mogą znaleźć zastosowanie jako kultury startowe do produkcji żywności fermentowanej lub jako kultury ochronne.

Doświadczenie, które zdobyłam podejmując problematykę identyfikacji bakterii na poziomie szczepu opisałam w publikacji (Załącznik 4 II.D.13) i zaprezentowałam na konferencji (Załącznik 4 III.B.9). W publikacji tej skupiono się na problemie izolacji bakterii z żywności i wskazaniu metod identyfikacji, które mogłyby być pomocne w przemyśle lub inspekcji w celach potwierdzania obecności bakterii probiotycznych w żywności na poziomie szczepu. Jest to kluczowe, ponieważ właściwości probiotyczne są szczepozależne. W innej publikacji (Załącznik 4 II.D.22) zwrócono szczególną uwagę na problem hodowlaności bakterii. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy w produktach żywnościowych, szczególnie tych o niskich wartościach pH i przechowywanych w niskich temperaturach, bakterie mogą przechodzić w stan żywe, ale niehodowane, zwany VBNC (*ang. viable but non culturable*). W takim przypadku metody klasyczne, polegające na hodowli bakterii na pożywkach stają się nieprzydatne. W pracy tej przeanalizowano przydatność metod mikrobiologicznych, biochemicznych, genetycznych, proteomiki oraz innych technik molekularnych. Stwierdzono, że zgodnie z obecnym stanem wiedzy najlepszą metodą, która mogłaby pomóc w rzetelnym określeniu populacji bakterii probiotycznych na poziomie szczepu jest cystometria przepływowa, a także kombinacja metod hodowlanych i elektroforetycznych PFGE.

5.2. Bezpieczeństwo stosowania bakterii fermentacji mlekowej, ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe i oporność na warunki symulujące pasaż żołądkowo-jelitowy

Od 2013 r. byłam promotorem pomocniczym pracy doktorskiej Anny Rzepkowskiej (obecnie dr inż. Anny Łepeckiej), a wcześniej promotorem jej pracy magisterskiej. Tytuł pracy doktorskiej to: „*Ocena in vitro właściwości probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z żywności*”. Zakres pracy obejmował izolację bakterii fermentacji mlekowej z wędlin surowo dojrzewających i z serwatki kwasowej, a także ich ocenę bezpieczeństwa i przeżywalności w warunkach symulujących pasaż żołądkowo-jelitowy. Moja rola obejmowała opiekę naukową, pomoc w organizacji warsztatu pracy i w optymalizacji metod badawczych, a także nadzór nad realizacją prac eksperymentalnych. Praca ta została zakończona, a obrona doktoratu odbyła się w październiku 2017 r.

Równolegle od 2014 r. jestem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej Aleksandry Ołdak, a wcześniej byłam promotorem jej pracy magisterskiej i inżynierskiej. Temat pracy doktorskiej to: „*Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z żywności*”. Zakres pracy obejmuje ocenę porównawczą właściwości przeciwdrobnoustrojowych *in vitro* szczepów bakterii wyizolowanych z serów regionalnych: oscypek i koryciński. Moja rola polega na opiece naukowej, pomocy w organizacji warsztatu pracy i w optymalizacji metod badawczych, a także na nadzorze nad realizacją prac eksperymentalnych. Obecnie prace badawcze zostały zakończone, a doktorantka składa egzaminy doktorskie.

Dzięki ścisłej współpracy z doktorantkami udało się skonstruować unikalny zespół badawczy, zorganizować warsztat pracy i przeprowadzić szereg doświadczeń i analiz. Współpraca ta zaowocowała licznymi publikacjami i doniesieniami na konferencje, które zostaną omówione poniżej.

Zgodnie z zaleceniami FAO/WHO (2002) w trakcie oceny właściwości probiotycznych bakterii kolejnym krokiem, po właściwej identyfikacji jest ocena bezpieczeństwa. W swoich badaniach zajęłam się również tą tematyką. W publikacji (Zał.4 II.D.10) omówiono kryteria, które bierze się pod uwagę w ocenie bezpieczeństwa *in vitro*. Szczególną uwagę zwrócono na profil antybiotykooporności, dzięki któremu możliwa jest wstępna selekcja szczepów kandydatów. Antybiotykooporność jest nie tylko problemem pojawiającym się wśród bakterii patogennych, coraz więcej doniesień wskazuje także, że bakterie *Lactobacillus* mogą być swoistym rezerwuarem genów oporności na antybiotyki. W badaniach zaprezentowanych w publikacjach (Zał.4 II.A.6 i 7 oraz Zał.4 I.B.1) określono profil antybiotykooporności wyizolowanych przeze mnie szczepów bakterii fermentacji mlekowej z użyciem E-testów, czyli pasków nasączonych gradientem określonych antybiotyków. Dodatkowo w przypadku szczepów wyizolowanych z wędlin surowo dojrzewających przeprowadzono ocenę genotypową i potwierdzono obecność genów kodujących oporność na znane antybiotyki w DNA genomowym bakterii. W tych samych badaniach (Zał.4 II.A.6 i 7 oraz Zał.4 I.B.1) profil

antybiotykooporności uzupełniono o analizę aktywności enzymatycznej badanych szczepów bakterii, dzięki czemu udało się przeprowadzić selekcję i wykluczyć szczepy potencjalnie niebezpieczne. Wyniki badań zaprezentowano także na konferencjach (Zał.4 III.B.18, III.B.23, III.B.28).

Jednakże ocena bezpieczeństwa stosowania bakterii probiotycznych u ludzi nie może opierać się jedynie na badaniach *in vitro*. Ważnym elementem są badania prowadzone na zwierzętach laboratoryjnych (także immunodefektywnych) oraz badania kliniczne na dużych grupach populacyjnych. Uważa się, że probiotyki mogą być teoretycznie odpowiedzialne za cztery typy działań niepożądanych: zakażenia układowe, szkodliwą działalność metaboliczną, nadmierną stymulację układu odpornościowego u podatnych jednostek i transfer genów. Szczegółową analizę tych potencjalnych działań niepożądanych przeprowadzono w pracy (Zał.4 II.D.21).

W publikacji (Zał.4 II.A.8) przedstawiono problem narastającej antybiotykooporności, który dotyczy także szczepów LAB stosowanych jako kultury starterowe do żywności. Zauważono, że mechanizmy działania antybiotyków i bakteriocyn (niskocząsteczkowych białek, wytwarzanych m.in. przez bakterie fermentacji mlekowej) są podobne. Kluczową różnicą pomiędzy tymi związkami jest fakt nie generowania oporności u mikroorganizmów na bakteriocyny, w odróżnieniu od antybiotyków. Niewątpliwą zaletą bakteriocyn jest także ich selektywny sposób działania, co może przyczynić się do ochrony bioróżnorodności mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka. Problemem, który ogranicza stosowanie bakteriocyn jest ustalenie skutecznej drogi podawania ich pacjentom.

Ważnym elementem oceny bakterii probiotycznych są ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe, co zostało zaprezentowane w pracy (Zał.4 II.D.19). Z kolei w publikacjach (Zał.4 II.A.5, II.A.6 i II.A.7) oraz doniesieniach na konferencje (Zał.4 III.B.22, III.B.25, III.B.27, III.B.31, III.B.35, III.B.38, III.B.42) przeprowadzono ocenę właściwości przeciwdrobnoustrojowych *in vitro* m.in. z wykorzystaniem metody studzienkowej, czy ocenę hamowania przylegania drobnoustrojów wskaźnikowych do linii komórkowej Caco-2. Wykazano, że bakterie fermentacji mlekowej wyizolowane z żywności wykazują silne działanie przeciwko *Listeria monocytogenes*, a także zróżnicowane działanie względem *Salmonella*, *Escherichia coli* i innym drobnoustrojom psującym. W doniesieniach na konferencje zwrócono także uwagę na właściwości antagonistyczne względem *Staphylococcus aureus* (Zał.4 III.B.39). W wielu przypadkach aktywność antybakteryjna utrzymywała się po usunięciu z pożywki żywych komórek bakterii fermentacji mlekowej, a także po neutralizacji otrzymanego supernatantu. Sugeruje to, że niektóre z badanych szczepów bakterii mogą wytwarzać bakteriocyny lub inne niskocząsteczkowe białka o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Co więcej zauważono, że właściwości te są zależne od źródła izolacji.

Oporność na warunki panujące w przewodzie pokarmowym człowieka, rozumiane jako niska wrażliwość bakterii na działanie enzymów, soli kwasów żółciowych i niskie pH jest jednym z kluczowych kryteriów stawianych szczepom probiotycznym. Aby mógł

nastąpić efekt poprawy zdrowia bakterie muszą dotrzeć żywe do dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Ponieważ problem ten uznałam za niezmiernie ważny, postanowiłam rozwinąć tę tematykę w swojej pracy naukowej. W poszukiwaniu metodyki badawczej natknęłam się na mnogość rozwiązań. W pierwszej kolejności (*Zał.4 II.D.24* i *Zał.4 I.B.1*) posłużyłam się prostymi testami przeżywalności bakterii w zadanych warunkach, natomiast w pracy (*Zał.4 II.D.6*) skonstruowałam (razem z doktorantką Anną Rzepkowską) model statyczny *in vitro*, który uwzględnia ciągłość procesu trawienia. Z kolei w trakcie pobytu na stażu naukowym w Danii (*Zał.4 I.B.2*) określałam przeżywalność bakterii w modelu dynamicznym, co zostało omówione w osiągnięciu powyżej. Wybrane wyniki badań zostały także zaprezentowane na konferencjach (*Zał.4 III.B.14*, *III.B.19*, *III.B.34*). W wyniku tych doświadczeń zauważyłam, że kluczowym czynnikiem dyskryminacyjnym spośród tych, które stosowano w eksperymentach jest niskie pH soku żołądkowego. Większość badanych bakterii była wrażliwa pH 1,5, ale pewna część populacji bakterii, zależnie od szczepu, jest w stanie przetrwać w pH 2,0, natomiast wartość pH 3,5 nie wpływa istotnie na liczebność żywych komórek bakterii podczas trawienia. Co istotne, zauważono, że składniki żywności, w tym dodatek mleka (*Zał.4 II.D.6*) i śmietanki (*Zał.4 III.B.40*) wpływają ochronnie na komórki bakterii i zwiększa ich przeżywalność w modelu przewodu pokarmowego *in vitro*.

Reasumując zauważono, że niektóre bakterie wyizolowane z żywności mogą wykazywać właściwości definiowane jako probiotyczne. W publikacji (*Zał.4 II.D.23*) szczegółowo omówiono aspekty prawne związane z obecnością bakterii probiotycznych na rynku żywności, a także zwrócono uwagę na ich pochodzenie. Posiłkując się wynikami badań własnych oraz innych autorów, stwierdzono, że kluczowe jest udowodnienie możliwości przetrwania bakterii w warunkach przewodu pokarmowego człowieka, niezależnie od źródła izolacji, aby móc spodziewać się efektu probiotycznego. Wyniki badań własnych związane z tematem właściwości probiotycznych *in vitro* zaprezentowano także na konferencjach (*Zał. III.B.20*, *III.B.24*, *III.B.37*) oraz przygotowano zgłoszenie patentowe nowego szczepu *Lactobacillus brevis* i jego zastosowania (*Zał.4 III.B.2*).

5.3. Technologiczne wykorzystanie bakterii probiotycznych

Moje zainteresowania naukowe skupiają się także wokół wykorzystania bakterii probiotycznych i potencjalnie probiotycznych w projektowaniu żywności. Bakterie probiotyczne są najczęściej składnikiem mlecznych napojów fermentowanych, a także innych produktów powstających z mleka. Kierunkiem badawczym, który rozwinęłam w swojej pracy jest próba zastosowania innych surowców (pochodzenia roślinnego i zwierzęcego) jako nośników bakterii probiotycznych. Pierwszym surowcem jaki wykorzystałam w swoich badaniach była soja. Możliwości zastosowania bakterii o cechach probiotycznych do wytwarzania fermentowanego napoju sojowego zaprezentowano w pracach (*Zał.4 II.A.2*, *II.D.9*, *II.D.15*), a do wytwarzania tofu w pracy (*Zał.4 II.D.7*). Innymi nośnikami bakterii probiotycznych, które analizowano był sok

marchwiowy (Załącznik 4 II.D.16) oraz mus dyniowo-jabłkowy (Załącznik 4 II.D.8). Wyniki tych badań zaprezentowano także na licznych konferencjach (Załącznik 4 III.B.8, III.B.11, III.B.12, III.B.13, III.B.16, III.B.41).

Surowce pochodzenia zwierzęcego także testowałam jako nośniki bakterii probiotycznych. Zaprojektowano probiotyczny mleczny napój fermentowany o smaku ananasowo-kokosowym (Załącznik 4 III.B.21), synbiotyczne mleko fermentowane (Załącznik 4 III.B.29), potencjalnie probiotyczny napój mleczny (Załącznik 4 III.B.30), probiotyczne, fermentowane napoje z mleka koziego (Załącznik 4 III.B.36 i I.A.4), a także probiotyczny wyrób mleczno-czekoladowy (Załącznik 4 III.B.33).

Biorąc udział w projektach naukowych: „*Ekologiczne metody przetwórstwa mięsa i wyrobu produktów mięsnych bez stosowania dodatków azotanów i azotynów z uwzględnieniem wydłużania trwałości przechowalniczej tych produktów*” w 2013r., a także „*Przetwórstwo produktów roślinnych i zwierzęcych metodami ekologicznymi. Badania nad innowacyjnymi rozwiązaniami w zakresie przetwórstwa mięsa, z ograniczeniem dodatków azotanów i azotynów oraz jednoczesnym wydłużeniem trwałości przechowalniczej*” w 2017r. oraz „*Badania nad innowacyjnymi rozwiązaniami w zakresie przetwórstwa mięsa, z ograniczeniem dodatków azotanów i azotynów, w tym wykorzystanie fermentowanego mleka różnych ras zwierząt w zakresie przetwórstwa mięsa i podrobów w celu wpływu na zdrowotność, parametry sensoryczne i trwałość wyrobów*” w 2018r., których jednym z celów była próba zastosowania bakterii probiotycznych do produkcji wędlin surowo dojrzewających, zauważyłam, że mięso jest dobrym nośnikiem dla bakterii probiotycznych. Możliwości zastosowania bakterii o właściwościach probiotycznych w przemysłowej produkcji kielbas dojrzewających zaprezentowano w pracy (Załącznik 4 III.B.32, III.B.43). Dodatkowo zauważono, że kultury starterowe w postaci bakterii probiotycznych mogą zwiększyć bezpieczeństwo zdrowotne żywności, poprzez wytwarzanie bakteriocyn (Załącznik 4 II.D.14), czy wpływać korzystnie na jakość poprzez kształtowanie cech fizyko-chemicznych i sensorycznych (Załącznik 4 II.D.20) mięsnych wyrobów surowo dojrzewających. Analizę ryzyka zastosowania bakterii probiotycznych w produktach mięsnych zaprezentowano w pracach (Załącznik 4 II.A.1 i II.D.5).

5.4. Modelowanie matematyczne i jakość mikrobiologiczna żywności

Pokłosiem badań podjętych podczas realizacji pracy doktorskiej było skonstruowanie modeli matematycznych, które mogą zostać wykorzystane do prognozowania mikrobiologicznego wzrostu i przeżywalności bakterii probiotycznych w fermentowanym napoju sojowym. Badania te zostały opublikowane (Załącznik 4 II.A.3), a modele udostępnione na platformie internetowej (Załącznik 4 III.A.2). W późniejszym toku pracy naukowo-badawczej nie kontynuowałam badań nad modelowaniem matematycznym.

Jakość produktów probiotycznych w ocenie konsumentów była tematem pracy (Załącznik 4 II.D.17). W doniesieniach na konferencje także poruszono problem jakości żywności probiotycznej (Załącznik 4 III.B.15, III.B.17). W pracach tych zwrócono szczególną uwagę na analizę możliwości zaspokojenia potrzeb konsumentów. Wykazano, że przyczyną nie

kupowania probiotyków są: wyższa cena, brak wiary w działanie tego typu produktów, brak zaufania do produktów probiotycznych oraz brak zadowolenia z efektów działania. Pomimo tego stwierdzono, że większa część badanej populacji przywiązuje wagę do zdrowego sposobu odżywiania się i jest otwarta na nowości rynkowe. Czynniki te są ważne z punktu widzenia producentów żywności.

Innym obszarem, który podjęłam w swojej pracy jest jakość mikrobiologiczna żywności. W publikacji (Zał.4 III.D.11) omówiono problem psychrotrofów w chłodniczym przechowywaniu żywności, zwracając uwagę na nowe zagrożenia mikrobiologiczne i na możliwości zapobiegania im. W artykułach popularno-naukowych (Zał.4 II.D.26 i II.D.27) również podjęto problem higieny (szczególnie personelu) i monitoringu higieny w zakładach mięsnych.

Ważnym elementem mojej pracy naukowo-badawczej były także przeprowadzone ekspertyzy i opracowania na zamówienie. Ekspertyzy dotyczyły innowacyjności produktów (Zał.4 III.M1-.2), natomiast prace zleczone - oceny jakości mikrobiologicznej nowo zaprojektowanych wyrobów (Zał.4 III.M.3-5).

W latach 2017 i 2018 byłam wykonawcą w projektach finansowanych przez MRiRW "Przetwórstwo produktów roślinnych i zwierzęcych metodami ekologicznymi: Badania nad optymalizacją oraz rozwojem innowacyjnych rozwiązań w zakresie przetwórstwa w celu podnoszenia wartości prozdrowotnych produktów ekologicznych" Dotacja Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi na rok 2017 oraz "Przetwórstwo produktów roślinnych i zwierzęcych metodami ekologicznymi: Badania nad innowacyjnymi rozwiązaniami w celu poprawy cech i parametrów sensorycznych produktów przetwórstwa owoców i warzyw ekologicznych z uwzględnieniem zachowania składników odżywczych otrzymywanych produktów" Dotacja Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi na rok 2018. Efektem badań w obu tych projektach było opracowanie receptur wysokobiałkowych batonów ekologicznych, a także kompleksowa ocena jakości tych wyrobów (wartość odżywcza, jakość mikrobiologiczna, fizyko-chemiczna, sensoryczna i tekstura). W ramach badań określono także termin przydatności do spożycia, a raporty z badań zostały opublikowane (Zał.4 II.E.3, II.E.4). W 2018 r. w ramach podsumowania prowadzonych badań na rzecz rolnictwa ekologicznego, przeprowadziłam również szkolenie dla producentów żywności ekologicznej i doradców w Ministerstwie Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Obecnie biorę udział w projekcie naukowym „Opracowanie systemu monitorowania marnowanej żywności i efektywnego programu racjonalizacji strat i ograniczania marnotrawstwa żywności”, akronim: PROM, finansowanym przez NCBiR w ramach konkursu Gospostrateg 1/385753/1NCBR/2018. Zakres prac, w których uczestniczę jako wykonawca obejmuje określenie jakości mikrobiologicznej i fizyko-chemicznej różnych kategorii żywności, która jest przechowywana dłużej niż deklarowana przez producenta data minimalnej trwałości. Celem działań jest wyznaczenie faktycznej daty decydującej o bezpieczeństwie żywności.

W przyszłości pragnę kontynuować pracę naukowo-badawczą związaną z probiotykami i szeroko rozumianą jakością żywności.

6. Wskaźniki dokonań naukowych

Lp.	Nazwa pisma	Liczba publikacji		IF*	IF(5-letni)	Punkty MNiSW**	Suma punktów
		przed doktoratem	po doktoracie				
A. Publikacje w czasopismach naukowych posiadających współczynnik wpływu Impact Factor (IF), znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports (JCR)</i>							
1	Biomed Research International (2017)	-	1	2,583	2,931	25	25
2	Biomed Research International (2018)	-	1	2,583	2,931	25	25
3	Current Microbiology	-	1	1,519	1,563	15	15
4	Fleischwirtschaft	-	1	0,112	0,096	15	15
5	International Journal of Dairy Technology	-	1	1,225	1,245	20	20
6	International Journal of Food Properties	-	1	1,845	1,610	25	25
7	International Journal of Food Science & Technology	-	1	2,383	2,173	25	25
8	LWT-Food Science and Technology	-	1	2,329	2,929	35	35
9	Plant Science	-	1	3,437	4,148	35	35
10	Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej	-	1	0,783	0,820	15	15
11	Probiotic and Antimicrobial Proteins	-	1	2,345	2,091	20	20
12	The Journal of Microbiology	-	1	1,439	1,514	20	20
13	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość	-	1	0,190	0,295	15	15
RAZEM:		-	13	22,773	24,346	290	290
B. Czasopisma naukowe nieposiadające współczynnika wpływu IF, wymienione w części B wykazu Ministra							
1	Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria	-	1	-	-	15	15
2	Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny	-	1	-	-	6	6
3	Przemysł Spożywczy	-	3	-	-	12	36
4	Zeszyty Problemowe Postępu Nauk Rolniczych	-	1	-	-	9	9
5	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość	-	2	-	-	13	26
6	Żywność. Nauka. Technologia. Jakość	4	-	-	-	8	32
RAZEM:		4	8	-	-	4	124

C. Oryginalne prace twórcze opublikowane w innym naukowym czasopiśmie zagranicznym, w języku angielskim							
1	Fleischwirtschaft International	-	1	-	-	4	4
2	Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences	-	1	-	-	4	4
RAZEM:		-	2	-	-	4	8
D. Rozdziały w monografiach naukowych							
1	Prace opublikowane jako rozdział w monografii w języku angielskim	-	4	-	-	5	20
2	Prace opublikowane jako rozdział w monografii w języku polskim	-	4	-	-	4	16
RAZEM:		-	8	-	-	9	36
E. Rozdziały w podręcznikach akademickich w języku polskim							
1	Rozdział	-	1	-	-	-	-
RAZEM:		-	1	-	-	-	0
F. Publikacje w materiałach konferencyjnych							
1	W formie abstraktów w języku angielskim	1	8	-	-	-	-
2	W formie abstraktów w języku polskim	5	27	-	-	-	-
RAZEM:		6	35	-	-	-	0
G. Publikacje popularno-naukowe							
1	Polskie Mięso	-	2	-	-	-	-
RAZEM:		-	2	-	-	-	0
H. Zgłoszenia patentowe							
1	Zgłoszenie patentowe	1	1	-	-	-	-
RAZEM:		1	1	-	-	-	0
I. Sekwencje nukleotydów zgłoszone i opublikowane w bazie GenBank NCBI							
1	Zgłoszenia sekwencji	-	78	-	-	-	-
RAZEM:		-	78	-	-	-	0
Razem wszystkie publikacje			159	22,773	24,346	-	458

* współczynnik IF zgodnie z rokiem publikacji

** liczba punktów według wykazu czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przypisana publikacji w oparciu o:

1. Ujednolicony wykaz ze strony internetowej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2007-2010)
2. Komunikat Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 20 grudnia 2012 r.
3. Komunikat Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 17 grudnia 2013 r.
5. Komunikat Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2014 r. (ze zmianami z 18 grudnia 2015 r.)
5. Komunikat Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 23 grudnia 2015 r.
6. Komunikat Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 9 grudnia 2016 r.
7. Komunikat Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 26 stycznia 2017 r.

Podsumowanie

- Suma punktów za publikacje, według komunikatów Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: **458** (**426** po uzyskaniu stopnia naukowego doktora),
- Sumaryczny *impact factor* (IF) publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **22,773** (**22,773** po uzyskaniu stopnia naukowego doktora),
- Liczba prac opublikowanych w czasopismach indeksowanych przez Journal Citation Reports (JCR) wynosi **13** (łącznie **290** punktów, co stanowi **63,3** % ogólnej liczby punktów),
- Indeks Hirscha opublikowanych prac według bazy Web of Science (na dzień 25.03.2019r.) wynosi: **4**,
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (na dzień 25.03.2019 r.) wynosi: **61** bez autocytowań **58**, według bazy Scopus: **78**, bez autocytowań **71**.

