

## AUTOREFERAT

**1. Imię i nazwisko:** Edyta Malinowska-Pańczyk

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

2000 Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Technologii Żywności, specjalność technologia żywności (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu) magister inżynier

2006 Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, stopień doktora nauk technicznych w zakresie technologii chemicznej; praca doktorska pt. „Inaktywacja bakterii pod wpływem wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze – znaczenie w technologii utrwalania żywności”

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

od 1.09.2006 – 31.08.2007 asystent w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej

od 1.09.2007 adiunkt w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U.2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U z 2016 r. poz. 1311):**

**A) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

„Wysokie ciśnienie jako niekonwencjonalna metoda utrwalania i przetwarzania żywności – ocena możliwości wykorzystania w przemyśle żywnościowym”

**B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

H1. Malinowska-Pańczyk, E., Kołodziejka, I., Murawska, D., Wołosewicz, G. 2009. The combined effect of moderate pressure and chitosan on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cells suspended in a buffer and on natural microflora of apple juice and minced pork. *Food Technology and Biotechnology*, 47 (2), 202-209.

IF<sub>2009</sub> – 0,976; MNiSzW – 25 pkt.

H2. Malinowska-Pańczyk, E., Kołodziejka, I., Saryczew, M. 2011. Changes in bacterial cells induced by high pressure at subzero temperature. *Systematic and Applied Microbiology*, 34 (2), 139-147.

IF<sub>2011</sub> – 3,366, MNiSzW – 35 pkt.

- H3. Malinowska-Pańczyk, E., Kołodziejska, I. 2013. The influence of moderate pressure and subzero temperature on the shelf life of cod, salmon, pork and beef minced meat. *Food Technology and Biotechnology*, 51 (4), 570-576.  
IF<sub>2013</sub> – 0,977; MNiSzW – 25 pkt.
- H4. Malinowska-Pańczyk, E., Walecka, M., Pawłowicz, R., Tylingo, R., Kołodziejska, I. 2014. The effect of high pressure at subzero temperature on proteins solubility, drip loss and texture of fish (cod and salmon) and mammal's (pork and beef) meat. *Food Science and Technology International*, 20 (5), 383-395.  
IF<sub>2014</sub> – 1,222; MNiSzW – 25 pkt.
- H5. Malinowska-Pańczyk, E., Kołodziejska, I. 2016. The effect of high pressure on formation of volatile amines in minced meat of cod (*Gadus morhua*). *European Food Research and Technology*, 242 (3), 415-420.  
IF<sub>2016</sub> – 1,664; MNiSzW – 30 pkt.
- H6. Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I. 2017. The effect of high pressure and subzero temperature on gelation of washed cod and salmon meat. *Food Technology and Biotechnology*, 55(3), 405-412.  
IF<sub>2016</sub> – 0,891; MNiSzW – 25 pkt.
- H7. Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I. 2018. Changes in enzymatic activity of fish and slaughter animals' meat after high pressure treatment at subzero temperatures. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 68, DOI: 10.1515/pjfn-2017-0019.  
IF<sub>2016</sub> – 1,276, MNiSzW – 15 pkt.

*(Wartość podanego wskaźnika impact factor zgodna z rokiem opublikowania; w przypadku prac, które ukazały się w 2017 i 2018 r. impact factor podano za rok 2016; punkty za publikacje naliczono zgodnie z komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 stycznia 2017 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych, z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach).*

## **C) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

### **1. Wprowadzenie**

Podstawowe znaczenie dla jakości i bezpieczeństwa żywności mają metody utrwalania. Tradycyjna obróbka termiczna zapewnia skuteczną inaktywację mikroorganizmów w produktach żywnościowych, ale może negatywnie wpływać na cechy sensoryczne i zawartość składników odżywczych. Z tego powodu nie słabnie zainteresowanie producentów żywności możliwością zastosowania nowych, nietermicznych metod utrwalania i przetwarzania żywności. W światowym piśmiennictwie można znaleźć wiele prac, w których prezentowane są wyniki badań dotyczące wykorzystania m.in. wysokiego ciśnienia, pulsującego pola elektrycznego, mano-termo-sonikacji lub zimnej plazmy w przemyśle żywnościowym. Wśród nich wysokie ciśnienie uważane jest za jedną z najbardziej obiecujących metod utrwalania i obróbki żywności.<sup>1,2</sup>

Pierwsze doniesienia dotyczące zastosowania wysokiego ciśnienia do inaktywacji bakterii pojawiły się już w 1895 r. Kilka lat później Hite<sup>3</sup> wykazał, że zastosowanie wysokiego ciśnienia powoduje wydłużenie okresu chłodniczego przechowywania mleka. Jednak dopiero na początku lat 90-tych XX wieku technika wysokociśnieniowa została po raz pierwszy wykorzystana do utrwalania żywności kwaśnej i pierwsze produkty, takie jak dżemy i soki owocowe, pojawiły się na rynku w Japonii. Obecnie wysokie ciśnienie jest już stosowane podczas produkcji wyrobów mięsnych, produktów mleczarskich oraz przetworów owocowo-warzywnych. W 2015 r. światowy rynek żywności, otrzymanej poprzez zastosowanie obróbki wysokociśnieniowej, osiągnął wartość około 9,8 mld dolarów. Szacuje się, że w 2025 r. jej wartość rynkowa wyniesie 54,77 mld dolarów.<sup>4</sup> Na całym świecie, nadal aktywnie prowadzone są jednak badania nad możliwością szerszego wykorzystania wysokiego ciśnienia do utrwalania i przetwarzania żywności. Mają one na celu przedstawienie sektorowi spożywczemu norm technicznych osiągnięcia efektu pasteryzacji za pomocą tej metody. Oprócz aspektów dotyczących zdrowotności i bezpieczeństwa produktów otrzymanych przy użyciu wysokiego ciśnienia, brana jest również pod uwagę ich wartość ekonomiczna.

<sup>1</sup> Farkas, D.F. (2016). A short history of research and development efforts leading to the commercialization of high-pressure processing of foods. In V.M. Balasubramaniam, G. V. Barbosa-Canovas, & H. L. M. Lelieveld (Eds.), High pressure processing of Food: Principles, technology and applications. Springer.

<sup>2</sup> Huang, S.W., Wu, S.J., Lu, J.K., Shyu, Y.T., Wang, C.Y. (2017). Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. Food Control, 72, 1-8.

<sup>3</sup> Hite, B.H. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. Morgantown. Bull WV Univ. Agric. Exp. Sta. Morgantown, 58, 15-35.

<sup>4</sup> Visiongain, (2015). The food high pressure processing (HPP) technologies market forecast 2015-2015: Pascualization & Bridgmanization

Racjonalnym uzasadnieniem zastosowania wysokiego ciśnienia zamiast podwyższonej temperatury w procesach utrwalania żywności jest zachowanie jej naturalnego smaku, zapachu i w przypadku większości produktów także barwy. Ciśnienie działa natychmiastowo i równomiernie niezależnie od wielkości i geometrii próbki. Na ogół związki o małej masie cząsteczkowej, wśród nich substancje zapachowe, barwniki lub biologicznie aktywne składniki, w tym witaminy, pozostają nienaruszone. Z kolei zmiany w strukturze innych składników, jak na przykład w białkach, w tym enzymatycznych, zachodzące pod wpływem działania wysokiego ciśnienia, w niektórych przypadkach mogą ograniczać przydatność tej metody jako procesu łagodnego przetwarzania, natomiast w innych efekt ten może być korzystny w kształtowaniu właściwości produktów żywnościowych.<sup>5</sup>

Efekt pasteryzacji może być osiągnięty po zastosowaniu wysokiego ciśnienia w zakresie 400-600 MPa w temperaturze 20-35°C. W tych warunkach mogą jednakże wystąpić niekorzystne zmiany w składnikach żywności, prowadzące do pogorszenia właściwości produktów.<sup>6</sup> Taki sam poziom inaktywacji mikroorganizmów można uzyskać w umiarkowanych ciśnieniach (100-300 MPa) poprzez podwyższenie lub obniżenie temperatury procesu, jednocześnie zmniejszając negatywny wpływ na składniki żywności.<sup>4,7</sup> Z analizy światowego piśmiennictwa wynika, że wysokociśnieniowe – niskotemperaturowe (poniżej 0°C) warunki mogą powodować inaktywację drobnoustrojów w większym stopniu niż ma to miejsce w temperaturach dodatnich.<sup>6</sup>

Przy praktycznym zastosowaniu ciśnienia w ujemnej temperaturze istnieje możliwość wytwarzania wysokich ciśnień bez użycia drogiej, specjalistycznej aparatury. W aparacie skonstruowanym przez Edwarda Dunajskiego w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej (KChTiBŻ PG) przyjęto unikatowe rozwiązanie utrzymywania próbki w stanie niezamrożonym w oparciu o zjawisko generowania ciśnienia w szczelnie zamkniętym naczyniu, podczas obniżania temperatury poniżej 0°C do około -22°C. Wiedza o tym co dzieje się w żywności poddanej działaniu ciśnienia w temperaturach ujemnych w warunkach gdy woda pozostaje w stanie ciekłym jest jak dotąd ograniczona.

<sup>5</sup> Norton, T., Sun, D.W. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an alternative processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 2-34.

<sup>6</sup> Simonin, H., Duranton, F., de Lamballerie, M. (2012). New insights into the high pressure processing of meat and meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 285-306.

<sup>7</sup> Moussa, M., Perrier-Cornet, J.M., Gervais, P. (2006). Synergistic and antagonistic effects of combined subzero temperature and high pressure on inactivation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 150-156.

## Cel pracy

Celem prac wskazanych jako osiągnięcie naukowe było oszacowanie korzyści i ograniczeń ze stosowania wysokich ciśnień (do 200 MPa) w temperaturze poniżej 0°C, jako metody utrwalania i przetwarzania żywności, poprzez poznanie przemian, jakie zachodzą w tych warunkach w wybranych składnikach tkanki mięśniowej ryb i zwierząt stałocieplnych.

## Omówienie wyników

### *Wpływ wysokiego ciśnienia na białka mięsa ryb i zwierząt stałocieplnych*

Traktowanie mięsa ryb i zwierząt stałocieplnych ciśnieniem w zakresie 60-193 MPa w temperaturze  $-5 \div -20^{\circ}\text{C}$  powodowało obniżenie rozpuszczalności białek w 0,9 M NaCl. Wielkość tych zmian zależała od pochodzenia mięsa. Wykazano, że białka mięsa dorsza i lososia były bardziej podatne na denaturację/agregację indukowaną ciśnieniem niż białka pochodzące z mięsa bydlęcego i świńskiego. Po traktowaniu mięsa ryb ciśnieniem 193 MPa rozpuszczalność białek zmniejszyła się o około 40%. W tych warunkach rozpuszczalność białek w mięsie bydlęcym zmniejszyła się tylko nieznacznie. Mniej odporne na ciśnienie były białka mięsa świńskiego, których rozpuszczalność po procesie ciśnieniowania w 193 MPa zmniejszyła się o 20% [H4]. Różnice w stabilności białek pod zwiększonym ciśnieniem w zależności od gatunku mięsa, podobnie jak w przypadku procesu termicznego, wynikają z różnic w ich budowie cząsteczkowej.<sup>8</sup>

Zastosowanie ciśnienia 193 MPa w  $-20^{\circ}\text{C}$  tylko w niewielkim stopniu wpływało na rozpuszczalność białek mięsa ryb i zwierząt stałocieplnych w 0,15 M roztworze NaCl. W roztworach o niskiej sile jonowej rozpuszczają się przede wszystkim białka sarkoplazmatyczne. Uzyskane wyniki wykazały, że są one w znacznie mniejszym stopniu podatne na denaturację indukowaną wysokim ciśnieniem niż białka miofibrylarne [H4].

Ograniczenie zmian denaturacyjnych białek mięśniowych można osiągnąć poprzez dodatek do mięsa substancji stabilizujących, tj. sacharozy lub glukozy, przed procesem ciśnieniowania.<sup>9</sup> Wykazano, że sacharydy, w stężeniu 0,275 mola/100 g mięsa, wywierały ochronne działanie wobec białek mięśniowych ryb poddanych działaniu ciśnienia 111 MPa w temp.  $-10^{\circ}\text{C}$ , gdyż ich rozpuszczalność była podobna do tej uzyskiwanej w próbach nieciśnieniowanych. Jednakże, obecność cukrów w mięsie traktowanym ciśnieniem 193 MPa

<sup>8</sup> Ashie I.N.A., Lanier T.C., MacDonald G.A. (1999). Pressure induced denaturation of muscle proteins and its prevention by sugars and polyols. *Journal of Food Science* 64, 818-822.

<sup>9</sup> Uresti, R.M., Velazquez, G., Vazquez, M., Ramirez, J.A., Torres, J.A. 2005. Effect of sugars and polyols on the functional and mechanical properties of pressure-treated arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) proteins. *Food Hydrocolloids*, 19, 964-973.

w  $-20^{\circ}\text{C}$  tylko w niewielkim stopniu chroniło białka przed zmianami denaturacyjnymi. Wyniki te wskazują, że działanie ochronne sacharydów zależy od wielkości ciśnienia i temperatury procesu. Z kolei rozpuszczalność białek mięsa świńskiego po działaniu ciśnienia 193 MPa w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  w obecności sacharozy była mniejsza o 10%, w porównaniu do mięsa ciśnieniowanego bez dodatku tego sacharydu. W obecności sacharydów rozpuszczalność białek mięsa bydłęcego nieznacznie się zwiększyła, ale różnice te nie były statystycznie istotne [H4].

Wykazano, że ciśnienie 60 MPa w temp.  $-5^{\circ}\text{C}$  tylko w niewielkim stopniu wpływało na rozpuszczalność białek mięsa dorsza, łososia, świni i bydła. Jednocześnie w tych warunkach próby znajdowały się w stanie niezamrożonym, co eliminowało szkodliwy wpływ kryształów lodu. Dlatego też sprawdzono jakim zmianom ulegają białka mięśniowe przechowywane przez dłuższy czas w tych warunkach. Stwierdzono, że już po 24 godzinach przechowywania pod ciśnieniem 60 MPa, rozpuszczalność białek zmniejszyła się istotnie. W tych warunkach białka ryb były bardziej wrażliwe niż białka ssaków. Po 7 dniach przetrzymywania pod ciśnieniem 60 MPa w temp.  $-5^{\circ}\text{C}$  rozpuszczalność białek dorsza i łososia zmniejszyła się o około 50%, podczas gdy rozpuszczalność białek mięsa świńskiego i bydłęcego obniżyła się o 20%. Zastosowanie niskiego ciśnienia: 60 MPa w temp.  $-5^{\circ}\text{C}$  nie jest zatem dobrą metodą przechowywania mięsa. W literaturze brak jest danych na temat zmian zachodzących w białkach mięśniowych podczas przechowywania mięsa pod ciśnieniem w warunkach kiedy woda pozostaje w stanie ciekłym [H4].

Kierunek zmian rozpuszczalność białek miofibrylarnych zależy od tego, czy izolowane miofibryle czy całe mięso są poddane procesowi ciśnieniowania. Rozpuszczalność białek z wyizolowanych miofibryli ryb zawieszonych w 0,1 M roztworze KCl zwiększyła się po traktowaniu próbek ciśnieniem 60, 111 i 193 MPa, odpowiednio, w temperaturze  $-5$ ,  $-10$  i  $-20^{\circ}\text{C}$ . Zawartość rozpuszczonych białek miofibrylarnych łososia i dorsza poddanych działaniu ciśnienia 193 MPa była wyższa, odpowiednio, 2 i 1,5 razy niż w próbach nieciśnieniowanych. Rozpuszczanie białek miofibrylarnych w 0,1 M roztworze KCl indukowane ciśnieniem, potwierdzono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Wykazano, że pod wpływem działania ciśnienia 111 i 193 MPa z miofibryli zostały uwolnione dwa łańcuchy lekkie miozyny, tropomiozyna, troponina T i aktyna [H6]. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowane ciśnienie powoduje depolimeryzację aktomiozyny, miozyny i aktyny, a oddziaływania hydrofobowe, które prawdopodobnie uczestniczą w stabilizacji

miofibrili, są zakłócone przez ciśnienie i w konsekwencji prowadzi to do zwiększonej rozpuszczalności białek w roztworach o niskiej sile jonowej.<sup>10,11</sup> Z kolei traktowanie wymytego mięsa łososia i dorsza ciśnieniem 60 MPa zmniejszyło rozpuszczalność białek do około 80-90%, a po działaniu 193 MPa do 60%, co wskazuje, że w tych warunkach następuje denaturacja białek [H6]. Wyniki te były zbliżone do tych uzyskanych z mięsem niewymytmym [H4].

Obróbka ciśnieniowa wymytego mięsa dorsza tylko nieznacznie zmniejszyła rozpuszczalność białek w roztworze zawierającym SDS i mocznik, natomiast rozpuszczalność wymytego mięsa łososia była podobna do mięsa nietraktowanego ciśnieniem. Wyniki te wskazują, że ciśnienie 193 MPa w temp. -20°C nie powoduje powstania wiązań kowalencyjnych, w tym wiązań disiarczkowych, dlatego też 100% białek w ciśnieniowanym wymytmym mięsie ryb rozpuszczała się w roztworze zawierającym SDS, mocznik i  $\beta$ -merkaptotanol. Profile elektroforetyczne białek wymytego mięsa dorsza i łososia różniły się między sobą. Nie stwierdzono natomiast różnic w elektroforetycznym profilu białek między próbkami przed i po działaniu ciśnienia. Wyniki te potwierdziły, że w warunkach wysokociśnieniowych nie tworzą się wiązania disiarczkowe w białkach ryb [H6].

Zmiany denaturacyjne białek zachodzące pod wpływem wysokiego ciśnienia zostały potwierdzone za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Na termogramach uzyskanych podczas analizy DSC surowego mięsa świńskiego i bydlęcego widoczne były trzy różne endotermiczne przejścia (odpowiadające temperaturze denaturacji poszczególnych białek) z wartościami  $T_{\max}$  wynoszącymi, odpowiednio: 56°C i 58°C (miozyna), 69°C i 68°C (białka sarkoplazmatyczne i kolagen), 79°C i 80°C (aktyna). Po traktowaniu mięsa zwierząt stałocieplnych ciśnieniem 111 i 193 MPa następowało stosunkowo niewielkie zmniejszenie entalpii przemiany denaturacyjnej miozyny i aktyny (wyrażone jako zmniejszenie pików odpowiadającym tym białkom). W przypadku białek ryb dorsza i łososia  $T_{\max}$  przejść endotermicznych były niższe niż  $T_{\max}$  odpowiadającym im białek mięsa zwierząt stałocieplnych. Wynosiły one dla mięsa dorsza i łososia, odpowiednio: 46°C (miozyna), 58 i 67°C (białka sarkoplazmatyczne), 75 i 77°C (aktyna). Obróbka ciśnieniowa (111 MPa w temp. -10°C) mięsa dorsza i łososia znacząco wpłynęła na krzywe DSC. Na uzyskanych termogramach widoczne było zmniejszenie pików, głównie odpowiadających miozynie, a w przypadku mięsa dorsza został on nieco przesunięty w kierunku niższej temperatury. W

<sup>10</sup> Suzuki, A., Suzuki, N., Ikeuchi, Y., Saito, M. (1991). Effects of high pressure treatment on the ultrastructure and solubilization of isolated myofibrils. *Agriculture and Biological Chemistry*, 55, 2467-2473.

<sup>11</sup> McArthur, A.J., Wilding P. (1996). The effect of high pressure on skeletal muscle myofibrils and myosin. *Progress in Biotechnology*, 13, 323-326.

wyższym ciśnieniu, 193 MPa i temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ , obserwowano dalsze zmniejszenie pików, związanych z denaturacją miozyny i aktyny z dorsza. W tych warunkach piki odpowiadające miozynie i aktynie mięsa łososia zanikły całkowicie. Wyniki analizy DSC wskazują, podobnie jak stwierdzono dla rozpuszczalności białek w roztworach soli, że białka zwierząt stałocieplnych są bardziej odporne na ciśnienie niż białka ryb bytujących w zimnych wodach [H4]. Podobne zjawisko jest charakterystyczne dla denaturacji termicznej miozyny, chociaż mechanizm denaturacji indukowanej temperaturą i ciśnieniem jest inny.<sup>12,13,14</sup>

#### *Wpływ wysokiego ciśnienia na właściwości funkcjonalne mięsa ryb i zwierząt stałocieplnych*

##### Wyciek cieplny i tekstura

Ogrzewanie surowego mięsa dorsza i łososia przez 15 minut w temp.  $80^{\circ}\text{C}$  spowodowało wyciek o około, odpowiednio, 27 i 21%. Ciśnieniowanie w 60 MPa nie wpływało na wyciek cieplny z mięsa ryb, natomiast wyższe ciśnienia powodowały jego zwiększenie. Ubytek cieplny po traktowaniu mięsa dorsza i łososia w 193 MPa wynosił, odpowiednio, 37 i 25%. Zwiększenie wycieku po ogrzewaniu ciśnieniowanego mięsa ryb można tłumaczyć zmianami w białkach miofibrylarnych, które zachodzą w warunkach wysokociśnieniowo-niskotemperaturowych [H4]. Z kolei działanie ciśnieniem w zakresie 60-193 MPa nie wpływało na wyciek cieplny mięsa świńskiego i bydlęcego.

Obróbka ciśnieniowa w 193 MPa i temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  nie wywierała istotnego wpływu na twardość i inne wyróżniki tekstury mięsa bydlęcego i świńskiego. Nie stwierdzono także różnic istotnych statystycznie pomiędzy twardością, sprężystością, spójnością i przeżuwalnością mięsa bydlęcego i świńskiego poddanego tylko ogrzewaniu w temp.  $80^{\circ}\text{C}$  przez 15 minut a mięsa ciśnieniowanego, a następnie gotowanego [H4].

Natomiast ogrzewanie mięsa ryb obniżało jego twardość. Było to prawdopodobnie wynikiem dysocjacji termicznej, enzymatycznej hydrolizy białka mięśniowego i obniżenie zawartości wody w mięsie.<sup>13</sup> Z kolei twardość mięsa dorsza i łososia po działaniu ciśnienia 193 MPa była mniejsza niż mięsa surowego, natomiast sprężystość i przeżuwalność nie uległy zmianie. W tych warunkach wzrosła jednakże spójność badanego mięsa. Twardość mięsa ryb ogrzewanego po traktowaniu ciśnieniem 193 MPa zmniejszyła się w porównaniu do mięsa tylko ciśnieniowanego i była zbliżona do mięsa gotowanego [H4].

<sup>12</sup> Davies, J.R., Bardsley, R.G., Ledward, D.A. (1998). Myosin thermal stability in fish muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 45, 61-68.

<sup>13</sup> Angsupanich, K., Ledward D.A. (1998). High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle. *Food Chemistry*, 63, 39-50.

<sup>14</sup> Sun, X.D., Holley, R.A. (2010). High hydrostatic pressure effects on the texture of meat and meat products. *Journal of Food Science*, 75, R17-R23.



## Właściwości żelujące mięsa ryb

Ciśnieniowanie w 193 MPa wymytego mięsa dorsza i łososia indukowało żelowanie białek miofibrylarnych; jednak twardość otrzymanych żeli była mniejsza o, odpowiednio, 26 i 28% niż twardość żeli indukowanych cieplnie (w temp. 90°C przez 15 minut). Lepsze właściwości żeli otrzymanych w procesie ogrzewania niż żeli uzyskanych po obróbce ciśnieniowej były prawdopodobnie spowodowane etapem 1-godzinnego przetrzymywania w temperaturze pokojowej, zastosowanym tylko przed ogrzewaniem. Na tym etapie mogło zachodzić sieciowanie białek w wyniku działania endogennej transglutaminazy (TGazy), co w konsekwencji prowadziło do powstawania twardszych żeli niż w procesie ciśnieniowania.<sup>15</sup> Z kolei żele uzyskane z wymytego mięsa łososia i dorsza w wyniku 2-etapowego procesu: ciśnieniowania w 193 MPa, a następnie ogrzewania w temp. 90°C przez 15 minut, były znacznie twardsze niż żele indukowane tylko ciśnieniem lub tylko termicznie. Miały one również najwyższą przeżuwalność. Sprężystość i spójność wszystkich prób były podobne niezależnie od warunków wytwarzania żelu. Siłę żelowania białek miofibrylarnych mięsa ryb określono również w teście penetracyjnym oraz za pomocą testu zginania.<sup>16</sup> Wyniki uzyskane w tych doświadczeniach potwierdziły te otrzymane poprzez analizę profilu tekstury. Siła żelowania białek miofibrylarnych była największa po zastosowaniu ciśnieniowania, a następnie ogrzewania. W teście zginania żele indukowane w dwuetapowym procesie miały najwyższe oceny wytrzymałości, a żele powstałe tylko w wyniku ciśnieniowania charakteryzowały się najniższymi wartościami [H6].

Mechanizm prowadzący do powstawania żeli o ulepszonych właściwościach reologicznych w wyniku dwóch procesów: ciśnieniowania i ogrzewania, nadal pozostaje niejasny. Przeprowadzone badania wykazały, że podobnie jak w temperaturze powyżej 0°C, ciśnieniowanie w temperaturze poniżej 0°C, powoduje denaturację i depolimeryzację białek miofibrylarnych.<sup>17,18</sup> Przypuszczalnie, zmiany wywołane ciśnieniem prowadzą do otwarcia struktury białka i mogą powodować większą liczbę dostępnych miejsc w cząsteczce, które ułatwiają aktywne sieciowanie miozyny.<sup>18</sup> Wysokie ciśnienie zwiększa hydrofobowość i liczbę grup sulhydrylowych w aktomiozynie. Może to być częściowo przyczyną ulepszonej siły żelowania.<sup>19</sup> Chociaż przeprowadzono wiele badań dotyczących mechanizmu indukcji

<sup>15</sup> An, H., Peters, M.Y., Seymour, T.A. (1996). Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 321-327.

<sup>16</sup> Lee, C.M. (1984). Surimi process technology: mechanically deboned, washed, and stabilized fish flesh is being increasingly used as a functional ingredient in fabricated seafood. *Food Technology*, 11, 69-80.

<sup>17</sup> Uresti, R.M., Velazquez, G., Ramirez, J.A., Vázquez, M., Torres, J.A. (2004). Effect of high-pressure treatments on mechanical and functional properties of restructured products from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1741-1749.

<sup>18</sup> Gilleland, G.M., Lanier, T.C., Hamann, D.D. (1997). Covalent bonding in pressure-induced fish protein gels. *Journal of Food Science*, 62, 713-733.

<sup>19</sup> Ikeuchi, Y., Tanji, H., Kimm K., Suzuki, A. (1992). Dynamic rheological measurements on heat-induced pressurized actomyosin gels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 1751-1755.

żelowania białek miofibrylarnych przez ciśnienie, to wiele pytań nadal pozostaje bez odpowiedzi. Potrzebne są dalsze prace w celu wyjaśnienia, które zmiany w białkach indukowane wysokim ciśnieniem są odpowiedzialne za poprawę żelowania termicznego białek mięśniowych.

### *Wpływ wysokiego ciśnienia na aktywność endogennych enzymów mięsa ryb i zwierząt stałocieplnych*

Mięso jest źródłem wielu enzymów proteolitycznych, które odgrywają ważną rolę w procesie tenderyzacji mięsa zwierząt rzeźnych. Ograniczona i selektywna proteoliza enzymatyczna podczas dojrzewania prowadzi do zmian w strukturze mięsa, w tkance łącznej i niektórych białkach miofibrylarnych. Fragmentacja miofibryli w mięsie zwierząt stałocieplnych jest dodatkowo skorelowana z jego kruchością po ogrzewaniu.<sup>20</sup> W przypadku mięsa ryb, enzymatyczna degradacja białek miofibrylarnych prowadzi do pogorszenia tekstury mięsa i sprzyja psuciu.<sup>21</sup>

Poddanie mięsa zwierząt stałocieplnych działaniu ciśnienia w ujemnej temperaturze, może zwiększyć aktywność endogennych proteaz, które uczestniczą w tenderyzacji mięsa. Aktywność enzymów proteolitycznych w mięsie bydlęcym, o maksimum aktywności przy pH 4,2 i 6,2, wzrosła o około 25% po traktowaniu ciśnieniem 111 MPa w temp. -10°C. Jednak po obróbce ciśnieniowej w 193 MPa ich aktywność zmniejszyła się do poziomu zbliżonego jak w mięsie nieciśnieniowanym. Z kolei endogenne, kwaśne i obojętne, proteazy mięsa świnińskiego (maksymalna aktywność w pH 6,0 i 7,0), zostały aktywowane przez obróbkę wysokociśnieniową. Ich aktywność zwiększyła się o, odpowiednio, 66 i 36%, po traktowaniu ciśnieniem 193 MPa. W przypadku kwaśnych proteaz (pH 4,0) mięsa świnińskiego ciśnienie to powodowało 28% wzrost ich aktywności.

Zastosowanie ciśnienia 193 MPa w temp. -20°C może być natomiast użyteczne w hamowaniu mięknięcia mięsa dorsza spowodowanego przemianami enzymatycznymi. W tych warunkach aktywność proteaz obojętnych i alkalicznych (pH 7,0 i 8,5) tego mięsa zmniejszyła się 3-krotnie, natomiast aktywność kwaśnych proteaz (pH 3,0) nie uległa zmianie. Takiego efektu nie stwierdzono, w przypadku enzymów proteolitycznych łososia. Były one bardziej odporne na ciśnienie niż enzymy dorsza. Kwaśne i alkaliczne proteazy w mięsie łososia nie zmieniły aktywności po obróbce ciśnieniowej, natomiast aktywność

<sup>20</sup> Toldra, F., Reig, M. (2015). Enzymes in meat and fish. in: Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality (ed. R. Yada) Elsevier Ltd., 199-212.

<sup>21</sup> Ahmed, Z., Donkor, O., Street, W.A., Vasiljevic, T. (2015). Calpains and cathepsins-induced myofibrillar changes in post mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. Trends in Food Science and Technology, 45, 130-146.

obojętnych proteaz zwiększyła się po działaniu ciśnieniu 60 MPa, a następnie w wyższych ciśnieniach obniżyła się do wartości jak w mięsie surowym. Wyższa odporność enzymów proteolitycznych mięsa łososia w porównaniu z enzymami dorsza może być spowodowana ochronnym działaniem lipidów. Łosoś zawiera około 7%, a mięso dorsza tylko 0,5-1% tłuszczów.<sup>22,23</sup>

Ochronne działanie lipidów w mięsie łososia wykazano również w przypadku endogennej TGazy. Chociaż aktywność tego enzymu w surowym mięsie dorsza była około 5 razy większa niż w mięsie łososia to już działanie ciśnienia 60 MPa prowadziło do jego całkowitej inaktywacji. Obniżenie aktywności TGazy mięsa łososia o 21% następowało dopiero po zastosowaniu ciśnienia 193 MPa [H7].

Działanie ciśnienia 193 MPa na mięso dorsza prowadziło również do inaktywacji endogennej demetylazy tlenu trimetyloaminy (TMAO), której aktywność bezpośrednio po procesie obniżyła się z 4,8 do 0,1 U/mg białka. Wymiernym efektem tego było mniejsze tempo powstawania dimetyloaminy (DMA) i formaldehydu (FA) z TMAO podczas przechowywania ciśnieniowanego mięsa w stanie zamrożonym. Ilość DMA i FA w mięsie zależała od temperatury przetrzymywania. Bezpośrednio po obróbce ciśnieniowej (193 MPa w temp. -20°C) zawartość DMA i FA w mięsie dorsza była podobna do stężenia oznaczonego w próbach nietraktowanych ciśnieniem. Jednakże, podczas przechowywania mięsa po procesie ciśnieniowania w temp. -5°C, szybkość powstawania tych dwóch składników była mniejsza niż w przechowywanym w tych samych warunkach mięsie surowym. Po 40 dniach przetrzymywania w tej temperaturze stężenie DMA-N i FA w mięsie ciśnieniowanym wyniosło, odpowiednio, 14 i 24 mg/kg mięsa, podczas gdy mięso surowe zawierało, odpowiednio, 133 i 166 mg/kg tych związków. W przypadku ciśnieniowanego mięsa dorsza przechowywanego w temp. -20°C zawartość DMA i FA była nieco niższa niż w mięsie nietraktowanym ciśnieniem, ale różnice te nie były istotne statystycznie [H5]. W dostępnej literaturze nie ma danych dotyczących wpływu ciśnienia na szybkość gromadzenia się DMA i FA podczas zamrażalniczego przechowywania mięsa ciśnieniowanych ryb. Jedynie Gou i in.<sup>24</sup> wykazali, że podczas chłodniczego przechowywania mięsa kałamarnicy (*Todarodes pacificus*) ilość DMA była znacznie mniejsza w próbach traktowanych ciśnieniem niż w

<sup>22</sup> Luczyńska, J., Paszczyk, B., Luczyński, M.J. (2014). Fatty acid profiles in marine and freshwater fish from fish markets in northeastern Poland. Archives of Polish Fisheries, 22, 181-188.

<sup>23</sup> Zeng, D., Mai, K., Ai, Q., Milley, J.E., Lall, S.P. (2010). Lipid and fatty acid compositions of cod (*Gadus morhua*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Journal of Ocean University of China, 9, 381-388.

<sup>24</sup> Gou, J., Lee, H.Y., Ahn, J. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of squid (*Todarodes pacificus*) during refrigerated storage. Food Chemistry, 119, 471-476.

mięsie nie poddanym obróbce, co również było skorelowane ze spadkiem aktywności demetylazy TMAO.

#### *Wpływ wysokiego ciśnienia na zawartość trimetyloaminy w mięsie dorsza*

Podczas przechowywania chłodniczego w mięsie ryb gromadzi się trimetyloamina (TMA) powstająca w wyniku mikrobiologicznego rozkładu TMAO. Wykazano, że zawartość TMA-N w mięsie dorsza wynosiła 2 mg/kg mięsa, niezależnie od poziomu początkowego zanieczyszczenia mikrobiologicznego poszczególnych partii badanego mięsa. Podczas przechowywania mięsa w warunkach chłodniczych szybkość tworzenia się TMA zależała od temperatury i liczby drobnoustrojów w badanych partiach mięsa. Próby zawierające względnie wysoką początkową liczbę bakterii (6,4 log j.t.k/g) po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C zawierały 422 mg TMA-N/kg mięsa, natomiast próby, w których ogólna liczba bakterii była mniejsza o 2 rzędy wielkości (4,2 log j.t.k/g) ilość TMA-N była o połowę mniejsza. Nagromadzenie TMA w mięsie przechowywanym w 2°C było znacznie wolniejsze niż w próbach przetrzymywanych w temp. 4°C, pomimo zbliżonego początkowego poziomu bakterii w mięsie (4,4 log j.t.k./g). Różnice w ilości powstającego TMA spowodowane były wolniejszym wzrostem populacji mikroflory bakteryjnej w mięsie podczas przechowywania w niższej temperaturze.

Ciśnieniowanie w 193 MPa nie wpływało na zawartość TMA w mięsie bezpośrednio po procesie. Jednak podczas przechowywania w warunkach chłodniczych gromadzenie TMA w próbach poddanych działaniu ciśnienia 193 MPa było znacznie wolniejsze niż w mięsie surowym. Niezależnie od temperatury przechowywania po 1 tygodniu zawartość TMA-N nie przekraczała 10 mg TMA-N/kg mięsa. Różnice w zawartości TMA pomiędzy ciśnieniowanymi próbkami pojawiły się dopiero po 2 tygodniach przechowywania w temp. 2 i 4°C. Wykazano, że zahamowanie gromadzenia TMA w ciśnieniowanym mięsie nie jest skorelowane z liczbą drobnoustrojów, które namnażają się w nim podczas chłodniczego przechowywania. Taki efekt był raczej wynikiem ciśnieniowej inaktywacji mikroorganizmów produkujących reduktazę TMAO, np. gramujemnych bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, (m.in. pałeczek z grupy coli), które nie były wykrywane przez cały okres przechowywania [H5].

### *Wpływ wysokiego ciśnienia na przeżywalność naturalnej mikroflory mięsa ryb i zwierząt stałocieplnych*

Wysokie ciśnienie 193 MPa w temp. -20°C nie zapewnia całkowitej inaktywacji naturalnej mikroflory mięsa ryb - dorsza i łososa oraz mięsa zwierząt stałocieplnych - świńskiego i bydłęcego, jednakże pozwala na poprawę ich jakości mikrobiologicznej i wydłużenie okresu przydatności do spożycia [H3 i H5]. Efekt ciśnienia zależał od poziomu i składu jakościowego początkowego zanieczyszczenia mikrobiologicznego surowca [H3 i H5]. Pozytywnym aspektem tej techniki jest znaczna inaktywacja i zahamowanie wzrostu mikroflory psychrofilnej, która jest główną przyczyną psucia mięsa podczas chłodniczego przechowywania. Co więcej, wysokie ciśnienie 193 MPa powoduje inaktywację bakterii z grupy coli oraz znacząco zmniejsza relatywnie wysoki poziom koagulazododatnich *Staphylococcus* naturalnie zanieczyszczających surowe mięso [H3].

Zwiększenie stopnia inaktywacji mikroorganizmów w mięsie można osiągnąć przez zastosowanie wysokiego ciśnienia w połączeniu z chitozaniem (2 mg/g mięsa) o wysokim stopniu deacetylacji (SD) - 96% (chitozan-96%). Ten bioaktywny polisacharyd posiada status GRAS (Generally Recognized As Safe) i może być dodawany do żywności. W przeciwieństwie do wielu innych znanych przeciwdrobnoustrojowych substancji wykazuje on działanie przeciwdrobnoustrojowe zarówno wobec gramujemnych jak i gramododatnich bakterii [H1]. Bezpośrednio po obróbce wysokociśnieniowej (w 193 MPa) mięsa świńskiego w obecności chitozanu-96% nie uzyskano zwiększonego efektu letalnego w porównaniu do efektu po zastosowaniu tylko pojedynczego czynnika, jednakże wzrost bakterii był zahamowany podczas przechowywania w temperaturze chłodniczej przez 8 dni. Ogólna liczba bakterii i liczba bakterii psychrofilnych tylko nieznacznie wzrosła podczas tego okresu przechowywania. W przypadku mięsa surowego (z lub bez chitozanu) lub tylko ciśnieniowanego, przechowywanego w tych samych warunkach, liczba tych dwóch grup drobnoustrojów zwiększyła się od 2 do 5 rzędów wielkości [H1].

Ze względu na to, że chitozan jest najlepiej rozpuszczalny w kwaśnym środowisku, jak również wykazuje największe działanie przeciwdrobnoustrojowe w niskim pH, może być używany jako konserwant „kwaśnej” żywności. W związku z tym sprawdzono jak dodatek chitozanu-96 w stężeniu 2 mg/ml wpłynie na przeżywalność naturalnej mikroflory surowego soku ze świeżych jabłek (pH 3,7) traktowanego ciśnieniem 193 MPa. Pośród naturalnej mikroflory soku jabłkowego, najbardziej wrażliwe na ciśnienie były drożdże. Żywe komórki tych mikroorganizmów nie były wykrywane w 1 mL soku jabłkowego podczas

przechowywania chłodniczego w temp. 5°C przez 15 dni. Taki efekt został również zaobserwowany wobec pleśni w przypadku kombinowanego działania ciśnienia i chitozanu-96%. Wyniki eksperymentów pokazały, że połączone działanie ciśnienia i chitozanu-96% efektywnie hamowało również wzrost bakterii podczas przechowywania soku przez 15 dni nie tylko w temp. 5°C ale także w 20°C [H1].

Mniejszy efekt wysokiego ciśnienia i chitozanu na naturalną mikroflorę mięsa niż na mikroflorę soku jabłkowego może wynikać z efektu ochronnego jakie składniki żywności, takie jak sacharydy i białka, wywierają na komórki mikroorganizmów, a także od dużej różnorodności gatunkowej mikroflory w tych produktach. Dodatkowo, zwłaszcza w mięsie, interakcje chitozanu z ujemnie naładowanymi grupami białek lub innych składników mogą prowadzić do zmniejszenia skuteczności przeciwbakteryjnej polimeru. Pomimo tego, że umiarkowane ciśnienie pojedynczo lub w połączeniu z substancjami przeciwdrobnoustrojowymi, takimi jak chitozan, nie pozwala na pełną, zimną pasteryzację żywności, umożliwia znaczne wydłużenie okresu przechowywania żywności w warunkach chłodniczych [H1].

#### *Zmiany w komórkach indukowane przez wysokie ciśnienie w temperaturze poniżej 0°C*

Bakterie różnią się wrażliwością na działanie ciśnienia w ujemnej temperaturze już pomiędzy szczepami należącymi do tego samego gatunku. Komórki znajdujące się w logarytmicznej fazie wzrostu w większym stopniu są podatne na ciśnienie niż komórki znajdujące się w fazie stacjonarnej [II.D.3].

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że śmierć komórek znajdujących się w fazie wykładniczej pod wpływem działania ciśnienia w temperaturze poniżej 0°C następuje w wyniku uszkodzeń prowadzących do utraty półprzepuszczalności błony cytoplazmatycznej. Wykazano związek między utratą przeżywalności komórek trzech różnych szczepów *E. coli* a ich zdolnością do plazmolizy, zwiększeniem przepuszczalności błony komórkowej na jodek propidyny i spadkiem wewnątrzkomórkowej zawartości ATP. Ponadto, w tych warunkach zaobserwowano znaczne obniżenie aktywności ATPazy związanej z błoną komórkową [H2]. W przypadku komórek w fazie stacjonarnej, śmierć następowała również pod wpływem uszkodzeń błony cytoplazmatycznej, ale zakres zmian zależał od wrażliwości na ciśnienie danego szczepu. Wyższy poziom inaktywacji komórek skorelowany był z utratą integralności błonowej komórkowej, prowadził do zmniejszenia ilości ATP i aktywności ATPazy związanej z błoną [H2].

Zmiany w przepuszczalności błony cytoplazmatycznej w komórkach bakteryjnych wszystkich badanych szczepów znajdujących się w fazie wykładniczej, po traktowaniu ciśnieniem były nieodwracalne. W przypadku komórek w fazie stacjonarnej, nieodwracalna utrata półprzepuszczalności błony cytoplazmatycznej była charakterystyczna dla szczepu wrażliwego na ciśnienie, *E. coli* IBA72, podczas gdy takie zmiany nie były obserwowane w szczepach ciśnienioodpornych. Uzyskane wyniki wykazały istotną rolę nieodwracalnych zmian przepuszczalności błony komórkowej w śmierci indukowanej ciśnieniem w temperaturze poniżej 0°C. Uszkodzenie błony komórkowej w warunkach wysokociśnieniowych może być połączone z degradacją RNA, która również ma miejsce [H2].

Analiza uzyskanych wyników i porównanie ich z danymi przedstawionymi przez innych autorów pozwala na stwierdzenie, że za ciśnieniową inaktywację mikroorganizmów odpowiedzialnych jest kilka czynników. Mogą one powodować śmierć komórek niezależnie od siebie lub poprzez szereg reakcji łańcuchowych rozpoczynanych przez jedno zdarzenie występujące pod wysokim ciśnieniem, które prowadzi do zmian w metabolizmie komórek i w konsekwencji do śmierci komórki. Ponadto, biorąc pod uwagę różnice we wrażliwości na ciśnienie bakterii, zwłaszcza szczepów należących do tego samego gatunku, potrzebne są dalsze prace w celu dokładnego wyjaśnienia mechanizmów i czynników determinujących, że jeden szczep jest w stanie przetrwać w warunkach wysokiego ciśnienia, a drugi nie.

### **Podsumowanie**

Wysokie ciśnienie w ujemnej temperaturze powoduje szereg zmian w składnikach tkanki mięśniowej ryb i zwierząt stałocieplnych. Niektóre z nich mogą zostać wykorzystane w przemyśle spożywczym do kreowania nowych produktów o ulepszonych właściwościach funkcjonalnych i sensorycznych, z kolei inne ograniczają zastosowanie tej techniki.

Pozytywnym zjawiskiem zachodzącym po traktowaniu mięsa zwiększonym ciśnieniem jest przede wszystkim zmniejszenie liczby naturalnej mikroflory mięsa ryb i zwierząt stałocieplnych co pozwala na przedłużenie okresu przechowywania mięsa w temperaturze chłodniczej. Dodatkowo podczas przechowywania ciśnieniowanego mięsa w temp. 4°C rozkład TMAO do TMA zachodzi wolniej niż w mięsie nietraktowanym ciśnieniem. Ciśnieniowa obróbka, szczególnie mięsa ryb, zapobiega powstawaniu nieprzyjemnego zapachu podczas ich chłodniczego przechowywania. Ciśnienie 193 MPa w temp. -20°C indukuje żelowanie białek miofibrylarnych bez konieczności stosowania procesu cieplnego. Otrzymane żele mają gładką i lśniącą powierzchnię oraz są delikatniejsze od tych

uzyskanych w wyniku obróbki termicznej. Z kolei proces dwustopniowy: ciśnieniowanie a następnie ogrzewanie, może być korzystny przy wytwarzaniu z surimi produktów typu komaboko charakteryzujących się dużą siłą żelowania.

Wysokie ciśnienie może być również zastosowane do ograniczania negatywnych zmian spowodowanych działalnością endogennych enzymów proteolitycznych w mięsie dorsza, ponieważ prowadzi do znaczącego zmniejszenia aktywności neutralnych i alkalicznych proteaz. Natomiast ciśnieniowanie mięsa zwierząt stałocieplnych może zwiększać aktywność proteaz uczestniczących w tenderyzacji mięsa.

Z drugiej strony znacząca denaturacja białek po ciśnieniowaniu mięsa i zwiększenie jego twardości może ograniczać możliwość wykorzystania wysokiego ciśnienia jako metody utrwalania żywności. Zmiany te wykluczają, aby surowce poddane działaniu ciśnienia mogły być oferowane konsumentowi jako mięso surowe.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Podstawy wiedzy teoretycznej i praktycznej z zakresu technologii żywności zaczęłam zdobywać już podczas nauki w Technikum Przemysłu Spożywczego w Krajence. Wiedzę pogłębiałam następnie podczas studiów na Wydziale Technologii Żywności Akademii Rolniczej (obecnie Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego) w Poznaniu. Swoją działalność naukową związaną z technologią żywności, rozpoczęłam natomiast w KChTiBŻ na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, gdzie realizowałam badania w ramach pracy doktorskiej, której promotorem była prof. dr hab. inż. Ilona Kołodziejska. We współpracy z dr. inż. Edwardem Dunajskim, który zaprojektował i stworzył prototyp urządzenia do generowania wysokiego ciśnienia, prowadziłam badania mające na celu dokonanie oceny możliwości wykorzystania niskotemperaturowych-wysokociśnieniowych warunków do inaktywacji mikroorganizmów w żywności. Wyniki uzyskane z doświadczeń przeprowadzonych na dużym zbiorze drobnoustrojów poszerzyły rezultaty innych autorów z badań w temperaturach dodatnich oraz uzupełniły, potwierdziły lub zweryfikowały ogólne prawidłowości określające podatność mikroorganizmów na inaktywację pod wpływem wysokich ciśnień. Wykazałam, że wysokie ciśnienie generowane w aparacie skonstruowanym w KChTiBŻ, nie pozwala na uzyskanie całkowitej inaktywacji wszystkich grup drobnoustrojów w warunkach modelowych lub celowo wprowadzonych do produktów żywnościowych. Bakterie gramujemne oraz z logarytmicznej fazy wzrostu były bardziej wrażliwe na działanie ciśnienia w temperaturze poniżej 0°C niż bakterie gramdodatnie i znajdujące się w fazie stacjonarnej. Różnice w ciśnieniodporności pojawiały



się nie tylko pomiędzy gatunkami, ale także już pomiędzy szczepami w obrębie jednego gatunku (II.D.1 i II.D.3). Duża zawartość tłuszczu i białka oraz obniżenie aktywności wody (do 0,92) nie wpływało ochronnie na komórki wrażliwego szczepu *E. coli* IBA72 traktowanego wysokim ciśnieniem w temp. -20°C. Przeżywalność bakterii w tych warunkach zwiększała się natomiast w obecności glukozy, laktozy, sacharozy i trehalozy. Nawet działanie ciśnienia 193 MPa w temp. -20°C przez 24 godziny nie powodowało całkowitej inaktywacji komórek tego szczepu (II.D.2). Zwiększenie skuteczności inaktywacji drobnoustrojów (o 1-2 rzędy wielkości) uzyskałam poprzez łączne użycie wysokiego ciśnienia i substancji przeciwdrobnoustrojowych, takich jak lizozym lub nizyna (II.A.7), natomiast dodatek chitozanu o SD 96% powodował, że bakterie nie były wykrywane w 1 mL próby (I.B.1). Przeprowadzone badania wykazały również, że przeżywalność bakterii *E. coli* i *S. aureus* celowo wprowadzonych do soku jabłkowego o pH 3,8 nie zmniejszyła się znacznie bezpośrednio po obróbce ciśnieniowej w 193 MPa i temp. -20°C. Jednakże żywe komórki obu szczepów nie były wykrywane w ciśnieniowanych próbach soku jabłkowego przechowywanego przez 10 dni w temperaturze 20°C. Efekt letalny był mniejszy, gdy próbki po traktowaniu ciśnieniem inkubowano w temperaturze chłodniczej (II.A.8). Badania dotyczące wpływu wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze na mikroorganizmy były prowadzone w ramach dwóch projektów badawczych Ministerstwa Nauki i Informatyzacji nr 3 P06T 030 25 oraz nr 2 P06T 060 28 i stanowiły podstawę mojej rozprawy doktorskiej pt. „Inaktywacja bakterii pod wpływem wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze – znaczenie w technologii utrwalania żywności”. Praca została wyróżniona decyzją Rady Wydziału Chemicznego PG oraz w konkursie Dorocznej Nagrody Polskiego Towarzystwa Chemicznego Oddział Gdański na najlepszą pracę doktorską w roku 2006.

Po uzyskaniu stopnia doktora w 2006 r. rozpoczęłam pracę jako asystent, a następnie jako adiunkt w KCHTiBŻ PG gdzie kontynuowałam badania dotyczące możliwości wykorzystania wysokiego ciśnienia w przetwarzaniu żywności i równolegle brałam również udział w pracach badawczych zespołu, kierowanego przez prof. dr hab. inż. Ilonę Kołodziejską, zajmującego się, m.in. wykorzystaniem naturalnych polimerów do otrzymywania biodegradowalnych, jadalnych opakowań do żywności. Polimery te mogą być pozyskiwane ze źródeł odnawialnych (np. ze skrobi) lub z uciążliwych dla środowiska produktów odpadowych - skór i kostnych elementów ryb oraz pancerzy skorupiaków (kolagen, żelatyna lub chitozan) (II.A.1, II.A.2, II.A.5). Badania te były finansowane z projektu badawczego własnego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N312 255638 pt. „Otrzymywanie jedno- i dwuskładnikowych folii z naturalnych

polimerów modyfikowanych chemicznie”, w którym byłam wykonawcą. W ramach prowadzonych badań wykazałam, że aktywność przeciwbakteryjna chitozanu zależy od jego SD i masy cząsteczkowej. Mniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe posiadały chitozany o niższym SD (73%) niż te o wyższej wartości SD (90 i 96%). Działanie bakteriobójcze chitozanów zależało również od temperatury inkubacji. Bakterie były bardziej podatne na działanie chitozanu w temp. 20°C niż w 4°C. Taki efekt spowodowany był prawdopodobnie przez stres w niskich temperaturach, który prowadzi do zmniejszenia liczby miejsc wiązania na powierzchni komórek (lub elektroujemności) dostępnej dla chitozanu.<sup>25</sup> Również folie chitozanowe wywierały działanie przeciwbakteryjne na bakterie gramujemne i gramododatnie. Dlatego też takie folie mogą znaleźć zastosowanie jako przeciwdrobnoustrojowe materiały do pakowania żywności, gdyż nie tylko chronią produkt przed niepożądanymi czynnikami środowiskowymi, ale także mogą zmniejszyć zanieczyszczenie mikrobiologiczne na jego powierzchni. Ponadto wykazałam, że włączenie chitozanu w folie żelatynowe powoduje, że stają się one opakowaniami aktywnymi. Obecność chitozanu w opakowaniach żelatynowych zapobiega również ich zbyt szybkiej degradacji podczas przechowywania opakowanych produktów. Podobnie jak ma to miejsce w roztworach, stopień inaktywacji bakterii wywierany przez folie chitozanowe wzrasta wraz ze zwiększaniem się SD polimeru (II.A.5).

Badania prowadzone w ramach projektu doprowadziły również do otrzymania nanokompozytów na bazie żelatyny lub skrobi i nanowypełniaczy - Nanofil®2 (organicznie modyfikowany krzemian zawierający długołańcuchowe łańcuchy alifatyczne oraz grupę benzylową) oraz NanoBent ZR-1 (bentonit modyfikowany chlorkiem dimetylobenzylo (C12-C18) alkiloamoniowym). Taka modyfikacja pozwoliła nie tylko na polepszenie właściwości mechanicznych i użytkowych folii skrobiowych oraz żelatynowych, ale również nadała im cechy opakowań o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (II.A.1, II.A.2). Nanokompozyty żelatynowe zawierające NanoBent ZR-1 powodowały całkowitą inaktywację wszystkich komórek bakterii *S. aureus* i *L. innocua*. Nieznacznie mniejsze działanie bakteriobójcze wobec tych bakterii wywierały nanokompozyty skrobiowe z NanoBent ZR-1. Słabsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wywierały folie żelatynowe i skrobiowe zawierające Nanofil®2. Wszystkie otrzymane nanokompozyty nie wykazywały bakteriobójczego lub bakteriostatycznego efektu wobec bakterii gramujemnych *E. coli* i *Pseudomonas fluorescens* (II.A.1, II.A.2).

---

<sup>25</sup> Tsai G.J., Su, W.H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 62, 239-243.

Brałam również udział w realizacji projektu pt. „Określenie możliwych sposobów i warunków zagospodarowywania odpadów rybnych z przetwórstwa łososi w firmie „Morpol” - studium problemów i możliwych rozwiązań”. Badania prowadzone przez zespół wykonawców wykazały, że produkty uboczne, tj. skóry, kręgosłupy lub głowy, pochodzące z przetwórstwa łososia mogą służyć jako źródło olejów bogatych w wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Olej rybi ekstrahowany jest z podobną, wysoką wydajnością, po zastosowaniu dwóch metod: enzymatycznej oraz tzw. ekstrakcji „na zimno.” Oleje uzyskane tymi dwoma metodami charakteryzują się dobrą jakością i wysoką zawartością kwasów: dokozaheksaenowego i eikozapentaenowego, przy czym opracowany nowatorski sposób tzw. ekstrakcji „na zimno” jest bardziej odpowiedni do tego celu niż metoda enzymatyczna, gdyż ta ostatnia wymaga stosowania określonej, zazwyczaj podwyższonej temperatury, co dodatkowo zwiększa koszty izolacji oleju (II.A.5). Opracowana metoda pozyskiwania oleju została również opatentowana (Patent PL 213261 - II.B.2).

W projekcie pt. „Zbadanie możliwości wykorzystania kapusty białej (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) na potrzeby fitoremediacji i biofumigacji gleby (POIG.01.03.01-00-119/08.) finansowanego w ramach Poddziałania 1.3.1 osi priorytetowej 1. Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka Państwa byłam kierownikiem zadania badawczego Z10: „Oznaczenie aktywności przeciwmikrobiologicznej i przeciwgrzybowej wytypowanych partii biopreparatu pochodzących z różnych etapów produkcji”. Projekt był realizowany we współpracy z Instytutem Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie oraz Uniwersytetem Rolniczym im. Hugona Kołłątaja w Krakowie i miał na celu określić możliwość wykorzystania kapusty białej do rekultywacji terenów zdegradowanych (o podwyższonej zawartości metali ciężkich), a także doprowadzić do opracowania nowoczesnej technologii pozyskania substratów, które posłużą do produkcji naturalnego środka ochrony roślin - biopreparatu. Wykazałam, że biopreparat uzyskany w Instytucie Chemii Przemysłowej był aktywny wobec bakterii - *E. coli*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) i grzybów - *Botrytis cinerea*, *Phoma lingam*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium culmorum*. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na Międzynarodowych Targach „Pomysły, Wynalazki, Nowe produkty iNEA 2013” w Norymberdze, a preparat nagrodzono złotym medalem.

W ostatnich latach moje zainteresowania naukowo-badawcze koncentrują się na poszukiwaniu nowych metod utrwalania mleka kobiecego. Od 2012 r. w Polsce powstają Banki Mleka Kobiecego, w których mleko jest gromadzone, utrwalane i przechowywane, a

następnie przekazywane przede wszystkim dla dzieci przebywających na oddziałach neonatologicznych. Pokarm ten jest nie tylko podstawą diety tych pacjentów, ale również jest elementem ich terapii. Mleko w banku poddawane jest procesowi pasteryzacji w temp. 62°C przez 30 minut (pasteryzacja długotrwała). Proces ten zapewnia bezpieczeństwo mikrobiologiczne, jednak prowadzi do strat wielu cennych składników pokarmowych i biologicznie aktywnych. Alternatywą do obecnie stosowanego sposobu utrwalania, może być zastosowanie wysokiego ciśnienia lub pasteryzacji wysokiej (wysoka temperatura, krótki czas). Takie rozwiązanie jest zgodne z zasadą, która mówi, że drobnoustroje szybciej ulegają niszczeniu niż składniki odżywcze w miarę podwyższania temperatury pasteryzacji. Zjawisko to wykorzystywane jest w przetwórstwie żywnościowym, gdzie dąży się do zastąpienia ogrzewania w niższych temperaturach letalnych i w dłuższym czasie przez ogrzewanie w wysokich temperaturach i w krótszym czasie, uzyskując ten sam efekt biologiczny. Zmiany wartości odżywczej i biologicznej mleka ludzkiego oraz jego trwałość po pasteryzacji wysokiej nie zostały jak do tej pory zbadane ze względu na brak niezbędnego urządzenia pozwalającego na taką obróbkę małych ilości mleka ludzkiego.<sup>26</sup> W zakończonym w tym roku projekcie badawczym nr 2013/09/B/NZ9/01779, finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki, prowadziłam badania mające na celu określenie skuteczności inaktywacji mikroorganizmów oraz poziomu wybranych składników biologicznych mleka kobiecego po zastosowaniu pasteryzacji wysokiej oraz działania wysokiego ciśnienia. W ramach projektu przeprowadzono badania z użyciem specjalnie skonstruowanego pasteryzatora mikrofalowego firmy Enbiotechnology pozwalającego na ogrzewanie małych objętości mleka w ściśle zaprogramowanym czasie w zadanej temperaturze. Wyniki uzyskane z użyciem wysokiego ciśnienia zostały przeze mnie zaprezentowane w formie referatu na zaproszenie na 55 EHPRG Meeting w Poznaniu (III.B.31). Wysokie ciśnienie 193 MPa powodowało mniejsze straty składników takich jak: witamina C,  $\alpha$ -laktoalbumina, wydzielnicza immunoglobulina A, laktoferyna i lizozym niż ogrzewanie w temp. 62°C przez 30 minut. W tych warunkach nie uzyskuje się jednak odpowiedniego poziomu inaktywacji mikroflory zanieczyszczającej. Z kolei zastosowanie ogrzewania przy użyciu promieniowania mikrofalowego pozwala na uzyskanie pełnego efektu pasteryzacji przy jednoczesnym skróceniu czasu utrwalania mleka i zmniejszeniu negatywnego wpływu wysokiej temperatury na składniki odżywcze oraz biologicznie aktywne. Wyniki realizowane w ramach tego projektu badawczego zostały już częściowo przedstawione w pracach II.A.3 i II.A.4. oraz

<sup>26</sup> Jensen, R.G., Jensen, G.L. (1992). Specialty lipids for infant nutrition. I. Milks and formulas. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 15, 232-245.

pozwołyły na opracowanie zgłoszenia patentowego pt. „Sposób pasteryzacji mleka, również ludzkiego, przy użyciu wysokiej temperatury generowanej polem mikrofalowym” (II.B.4). Zainteresowanie tą tematyką skutkowało również nawiązaniem współpracy z dr Aleksandrą Wesołowską prezes fundacji Bank Mleka Kobiecego oraz zaproszeniem mnie do udziału w pracach „Zespołu do spraw funkcjonowania laktariów w podmiotach wykonujących działalność leczniczą” powołanym przez Główny Inspektorat Sanitarny w Warszawie. Wymiernym efektem prac w zespole było powstanie książki pt. „Banki Mleka w Polsce. Funkcjonowanie w podmiotach leczniczych“ (II.D.10).

Równoległe z badaniami dotyczącymi mleka kobiecego brałam udział w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju pt. “Przedkliniczne badania możliwości zastosowania oryginalnej, polskiej bionanocelulozy (BNC) w medycynie regeneracyjnej w aspekcie bioimplantów w kardiochirurgii i chirurgii naczyniowej” (PBS2/A7/16/2013). Projekt realizowany był w ramach konsorcjum, w którym uczestnikami byli: Uniwersytet Medyczny w Gdańsku, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, Zakład Badawczo-Rozwojowy Centrum Techniki Okrętowej S.A., Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii im. Prof. Zbigniewa Religi oraz firma Bowil-Biotech Sp. z o.o. Obecnie do wytworzenia implantów kardiologicznych najczęściej są wykorzystywane tkanki biologiczne, polimery syntetyczne lub połączenia tych materiałów.<sup>27</sup> Interesującym materiałem, alternatywnym dla stosowanych biomateriałów, jest BNC, polisacharyd produkowany przez niektóre gatunki bakterii z rodzaju *Gluconacetobacter xylinus*. Produkcja błon jest stosunkowo tania, a materiał łatwiej dostępny, niż pozyskanie tkanek biologicznych,<sup>28</sup> dlatego koszt wytwarzania implantów może być zmniejszony. Dodatkowo, materiał ten spełnia większość wymagań stawianych biomateriałom stosowanym do produkcji implantów sercowo-naczyniowych. Przeprowadzone w ramach projektu badania uzupełniły lukę w dostępnym piśmiennictwie na temat podatności BNC na biodegradację w warunkach symulujących ludzkie osocze w obecności lub nieobecności drobnoustrojów chorobotwórczych. Dodatkowo możliwe było wskazanie metody, która pozwala na najszybsze zdiagnozowanie zmian degradacyjnych zachodzących w badanym materiale. Wykazano, że podczas 6-miesięcznej inkubacji w temp. 37°C w warunkach symulujących osocze krwi celuloza nie ulegała degradacji<sup>29</sup> (II.E.1).

<sup>27</sup> Rachwałik, M., Biały, D., Wawrzyńska, M. (2010). Mechaniczne protezy zastawek serca-historia i rozwój technologii. Acta Bio-Optica et Informatica Medica. Inżynieria Biomedyczna, 16(3), 265-267.

<sup>28</sup> Hu, Y., Catchmark, J. M. (2011). *In vitro* biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases. Acta Biomaterialia, 7(7), 2835-2845.

<sup>29</sup> Dederko, P., Malinowska-Parńczyk, E., Staroszczyk, H., Sinkiewicz, I., Szweda, P., Siondalski, P. 2017. *In vitro* biodegradation of bacterial nanocellulose in conditions simulating human plasma in the presence of selected pathogenic microorganisms. Polimery, (po recenzji).

W dalszej działalności naukowej zamierzam kontynuować rozpoczęte prace badawcze dotyczące wykorzystania wysokiego ciśnienia do przetwarzania żywności. Składnikiem mięsa, który odgrywa bardzo ważną rolę w jakości produktów mięsnych są również lipidy. Wysokie ciśnienie może wywierać na ten składnik mięsa niekorzystny wpływ, gdyż prowadzi do ich autooksydacji. W mięsie ryb takie zmiany następują przy stosowaniu stosunkowo wysokich ciśnień, powyżej 400 MPa. W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych na temat zależności szybkości autooksydacji od temperatury procesu i nie można przewidzieć jaki przebieg będą miały reakcje utleniania lipidów w mięsie poddawanych działaniu ciśnienia w temperaturze poniżej 0°C. Szczególnie interesujący jest również mechanizm prowadzący do poprawy właściwości żelujących białek mięśniowych pod wpływem dwustopniowego procesu ciśnieniowania i ogrzewania. Zrozumienie interakcji zachodzących pomiędzy białkami mięśniowymi podczas procesu żelowania indukowanego wysokim ciśnieniem lub w procesie dwustopniowym: ciśnieniowaniem, a następnie ogrzewaniem pozwoli na świadome projektowanie etapu ciśnieniowania w procesie technologicznym, nie tylko jako sposobu utrwalania produktów mięsnych, ale również jako operacji jednostkowej wpływającej na właściwości reologiczne gotowego produktu.

Zamierzam również kontynuować badania dotyczące wykorzystania wysokiego ciśnienia w utrwalaniu mleka kobiecego. Mleko kobiece dostarczane jest do banków mleka w stanie zamrożonym, następnie jest rozmrażane, pasteryzowane i ponownie przechowywane w temp. -20°C. Podczas tych zabiegów dochodzi do strat wielu cennych składników mleka. Alternatywą może być przechowywanie mleka kobiecego w stanie niezamrożonym pod wysokim ciśnieniem, z jednoczesną eliminacją trzech ostatnich etapów. Wiedza na temat przeżywalności mikroflory mleka i zmian w jego składnikach odżywczych i biologicznie aktywnych podczas przechowywania w niskotemperaturowych-wysokociśnieniowych warunkach jest zupełnie ograniczona. Wyniki tych badań powinny pozwolić na ocenę wykorzystania techniki wysokociśnieniowej jako metody utrwalania i przechowywania mleka kobiecego.

Moje plany badawcze dotyczą również możliwości wykorzystania naturalnych polimerów do otrzymywania biodegradowalnych opakowań do żywności. Interesującym materiałem do tego celu jest BNC, którą zamierzam otrzymywać poprzez hodowlę czystych kultur bakterii *G. xylinus* lub poprzez zastosowanie tzw. grzybka herbacianego – kombucha, w skład którego wchodzi żyjące w symbiozie bakterie octowe i drożdże. Prowadzone przeze mnie wstępne badania wykazały, że produkcja celulozy z użyciem kombuchy, może odbywać się na ekstraktach z wycisków owocowych lub ekstraktach z produktów ubocznych z

przemysłu tłuszczowego co zdecydowanie obniża koszty uzyskania tego polimeru. Celem przyszłych prac będzie opracowanie takich warunków prowadzenia procesu otrzymywania celulozy bakteryjnej, które pozwolą na uzyskanie opakowań o bardzo dobrych właściwościach użytkowych oraz opakowań aktywnych, przede wszystkim o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i przeciwutleniających.

Edyta Malinowska-Pomczyk