

Dr inż. Dorota Walkowiak-Tomczak
Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Zakład Technologii Owoców i Warzyw
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

AUTOREFERAT

informujący o osiągnięciach naukowo-badawczych

1. Imię i nazwisko: Dorota Walkowiak-Tomczak

2. Wykształcenie:

- 1983-1986 Liceum Ogólnokształcące w Poznaniu, profil biologiczno-chemiczny
- 1986-1991 Akademia Rolnicza im. A.Cieszkowskiego w Poznaniu, Wydział Rolniczy
 - Uzyskanie tytułu magistra inżyniera: 14 czerwca 1991, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Zakład Biotechnologii,
 - Tytuł pracy magisterskiej: „Fermentacja etanolowa przy zastosowaniu immobilizowanych komórek drożdżowych o modyfikowanych błonach plazmatycznych”,
 - Promotor – prof. dr hab. Włodzimierz Grajek.
- 2000 uzyskanie stopnia naukowego doktora z zakresu technologii żywności i żywienia, nadany przez Radę Wydziału Technologii Żywności, Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu
 - Temat rozprawy doktorskiej: „Mikrobiologiczna denitryfikacja soku z buraka ćwikłowego”,
 - Promotor – prof. dr hab. Janusz Czapski,
 - Wyróżnienie i nagroda Rektora za pracę doktorską.

3. Przebieg pracy zawodowej:

1991-2000 Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

- **Asystent:** obowiązki zawodowe – prowadzenie zajęć dydaktycznych (Akademia Rolnicza, Politechnika Poznańska, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza), prowadzenie prac badawczych, opieka nad pracą doświadczalną studentów.

2001-obecnie Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, od 2007r. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Zakład Technologii Owoców i Warzyw

- **Adiunkt:** obowiązki zawodowe - prowadzenie zajęć dydaktycznych (ćwiczenia, seminaria, wykłady), prowadzenie prac doświadczalnych w ramach projektów

badawczych (własnych, grantów MNiSW, projekt unijny IG), opieka nad pracami dyplomowymi studentów studiów inżynierskich i magisterskich, organizacja realizacji godzin dydaktycznych w Instytucie.

4. Działalność naukowo-badawcza

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

Moim osiągnięciem, będącym podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest monografia pt.: „Zmiany jakościowe śliwek (*Prunus domestica* L.) podczas przechowywania i suszenia oraz ocena właściwości prozdrowotnych suszu” (załącznik 8; Rozprawa Naukowa 450, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2013 r.).

Syntetyczny opis wskazanego osiągnięcia

Wprowadzenie

W ostatnich latach rozwija się tendencja poszukiwania przez konsumentów i producentów, surowców i produktów żywnościowych będących źródłem naturalnych przeciwutleniaczy bądź wykazujących inne działanie prozdrowotne. Takie cechy wykazują owoce i warzywa oraz ich przetwory. Odmiany śliwek uprawianych w warunkach krajowych charakteryzują się zbliżonym terminem dojrzewania i zbioru, co stwarza konieczność ich przechowywania, m.in. dla uzyskania korzystniejszych cen zbytu w wyniku przedłużenia okresu podaży, lub przeznaczenie większej części śliwek do przerobu, m.in. do produkcji suszu. Śliwki suszone są produktem o bardzo korzystnych właściwościach żywieniowych. Ich popularność w ostatnich latach zwiększa się, są coraz częściej traktowane jako przekąska będąca alternatywą dla typowych słodczy. Śliwka jest surowcem stosunkowo bogatym w związki polifenolowe (kwasy fenolowe, flawanole, flawonole, antocyjany), błonnik pokarmowy, składniki mineralne (potas, fosfor, wapń, magnez) i wykazuje wysoką aktywność przeciwutleniającą. Spożywanie śliwek, świeżych bądź suszonych, korzystnie oddziałuje na szereg funkcji organizmu, m.in. obniżenie ciśnienia krwi, poprawę profilu lipidowego we krwi, zmniejszenie zachorowalności na nowotwory, usprawnienie działania przewodu pokarmowego, regulację wypróżnień, obniżenie masy ciała.

Cel badań

Celem głównym pracy była ocena wybranych odmian śliwek (*Prunus domestica*) pod kątem ich zdolności przechowalniczych, zawartości związków bioaktywnych, zdolności przeciwutleniających oraz przydatności śliwek suszonych w żywieniu osób, u których stwierdzono choroby metaboliczne. Przeprowadzono również badania modelowe w celu poznania stabilności antocyjanów, kształtujących barwę i wartość prozdrowotną śliwek i ich przetworów.

Zakres pracy

- ocena wpływu odmiany śliwek na ich przydatność do przechowywania i zawartość związków aktywnych biologicznie,
- ocena wpływu przechowywania śliwek zbieranych w różnym stopniu dojrzałości, na aktywność przeciwutleniającą, zawartość polifenoli oraz jakość sensoryczną owoców,
- ocena wpływu stopnia dojrzałości i czasu przechowywania śliwek na barwę owoców i zawartość antocyjanów,
- ocena stabilności antocyjanów i barwy ekstraktów ze śliwek w układzie modelowym,
- ocena wpływu odwadniania osmotycznego i suszenia śliwek na zawartość związków fenolowych i aktywność przeciwutleniającą produktu,
- ocena wpływu spożywania śliwek suszonych na profil lipidowy krwi osób z zaburzeniami metabolicznymi.

Metodyka pracy

Badania prowadzono w trzech etapach

I - ocena dziesięciu odmian śliwek (*Prunus domestica* L.), pod względem jakości sensorycznej i zdolności przechowalniczych oraz aktywności biologicznej, na podstawie zdolności przeciwutleniającej i zawartości związków fenolowych (2008-2009).

II – suszenie śliwek kilku odmian, wybranych na podstawie pierwszego etapu i ocena suszu pod kątem wartości żywieniowej (zawartości błonnika pokarmowego) i aktywności przeciwutleniającej, w zależności od odmiany i metody suszenia (2009-2010). Susz odmiany, w której stwierdzono wysoką zawartość związków fenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą, jak również korzystne cechy sensoryczne, wybrano do trzeciego etapu badań.

III - ocena właściwości prozdrowotnych śliwek suszonych wybranej odmiany, na podstawie doświadczenia żywieniowego przeprowadzonego z udziałem ludzi z zaburzonym profilem lipidowym krwi (2010-2011).

Owoce śliw (*Prunus domestica*) (w sezonie 2008 i 2009 r.) po zbiorze posortowano wg stopnia dojrzałości na grupę dojrzałości zbiorczej i grupę dojrzałości konsumpcyjnej. Ocenie poddawano śliwki po zbiorze oraz po 2-4 tygodniach przechowywania w warunkach chłodniczych. Wybrane odmiany śliwek poddano suszeniu metodą osmotyczno-konwekcyjną i konwekcyjną. Aktywność przeciwutleniającą oznaczano metodą spektrofotometryczną z użyciem kationorodnika ABTS, zawartość polifenoli i antocyjanów metodą spektrofotometryczną i HPLC. Suchą masę określano metodą wagową, zawartość ekstraktu refraktometrycznie, kwasowość metodą miareczkową, parametry barwy spektrofotometrycznie w układzie CIE L*a*b*, a ocenę sensoryczną metodą skalowania punktowego lub hedonicznie. Ocenę właściwości prozdrowotnych śliwek suszonych przeprowadzono w oparciu o doświadczenie żywieniowe, na podstawie zmian profilu lipidowego krwi pacjentów spożywających po 100 g suszonych śliwek dziennie w czasie 6 tygodni.

Wyniki badań

Wszystkie wartości badanych parametrów fizyko-chemicznych i fizjologicznych śliwek były zależne od odmiany, stopnia dojrzałości i czasu przechowywania. Podczas przechowywania śliwek zawartość suchej masy i ekstraktu zwiększała się i była wyższa w owocach zebranych w stadium dojrzałości konsumpcyjnej niż w zbiorczej. Odwrotne tendencje wykazywały kwasowość i jędrność śliwek. Podczas przechowywania stwierdzono straty owoców na skutek ubytków masy w wyniku transpiracji (do 20%) oraz na skutek chorób grzybowych (do 16%). Obniżały się noty oceny sensorycznej. Najwyżej oceniono, po zbiorze i po przechowywaniu, śliwki odmian 'Valor' i 'Węgierka Zwykła', zaś najniżej śliwki 'Elena' i 'Čačanska Najbolja'. Owoce o większej kwasowości miały mniejsze tendencje do chorób fizjologicznych i cechowały się wyższymi notami oceny smaku. Najmniej podatne na choroby fizjologiczne i grzybowe były śliwki odmiany 'Valor', zaś najbardziej odmiany 'Elena' i 'Valjevka'. Największe tendencje do brązowienia enzymatycznego miększu wykazywały śliwki odmian 'Bluerfe' i 'Čačanska Najbolja', zaś najmniejsze 'Stanley' i 'Valjevka'. Na podstawie oceny sensorycznej, wielkości strat masy owoców, objawów chorób grzybowych i fizjologicznych, jako najbardziej przydatne do przechowywania uznano śliwki odmiany 'Valor', zaś najmniej śliwki odmian 'Elena' i 'Valjevka'. Zawartość polifenoli, w tym antocyjanów, i aktywność przeciwutleniająca były większe w owocach zebranych w stadium dojrzałości konsumpcyjnej niż zbiorczej i zwiększały się podczas przechowywania. Zatem dla uzyskania śliwek konsumpcyjnych o najwyższych walorach sensorycznych i żywieniowych, owoce powinny być zbierane w pełni dojrzałe. Wysoką zawartością polifenoli

i aktywnością przeciwutleniającą cechowały się śliwki ‘Čačanska Najbolja’, ‘Valor’, ‘Węgierka Zwykła’ i ‘Oneida’, zaś niską ‘Elena’ i ‘Valjevka’.

Podczas modelowych badań stabilności antocyjanów i parametrów barwy metodą płaszczyzn odpowiedzi, dla większości odpowiedzi uzyskano dopasowanie dla powierzchni 2-go stopnia (test $F < 0,0001$) oraz wysokie wartości współczynnika determinacji R^2 , co wskazuje na bardzo dobre dopasowanie równań regresji do danych empirycznych. Dla większości prób stwierdzono nieistotność testu braku dopasowania ($p > 0,05$), co umożliwia zastosowanie uzyskanych równań do przewidywania lub kształtowania cech badanych roztworów podczas przechowywania.

Przed suszeniem konwekcyjnym, część śliwek poddano odwadnianiu osmotycznemu w roztworze sacharozy, co spowodowało wzrost zawartości suchej masy i ubytek masy śliwek (do 22%). Wzrost temperatury odwadniania wpłynął na poprawę skuteczności odwadniania. W wyniku odwadniania osmotycznego nastąpiło obniżenie zawartości polifenoli i aktywności przeciwutleniającej w porównaniu ze świeżym surowcem, podobnie w wyniku suszenia osmotyczno-konwekcyjnego. Natomiast w śliwkach suszonych konwekcyjnie nastąpił wzrost tych parametrów, tym większy, im wyższa była temperatura i czas suszenia. Jedynie zawartość antocyjanów i kwercetyny obniżyła się w każdej próbie śliwek suszonych. Najkorzystniejszą metodą suszenia śliwek stosowanych w badaniach, było suszenie konwekcyjne w temperaturze 80 °C, które pozwoliło otrzymać produkt o największej aktywności przeciwutleniającej i zawartości polifenoli. Współczynnik korelacji między zawartością polifenoli i aktywnością przeciwutleniającą, w śliwkach świeżych i suszonych, wynosił $> 0,85$. Śliwki suszone charakteryzowały się wysoką zawartością błonnika całkowitego, średnio 11,3 g/100g produktu. Najwyższy poziom jego frakcji rozpuszczalnej stwierdzono w odmianach ‘Valor’ i ‘Oneida’.

W doświadczeniu żywieniowym z udziałem grupy pacjentów o zaburzonem profilu lipidowym, dieta z dodatkiem śliwek suszonych spowodowała wzrost spożycia potasu i błonnika pokarmowego w dziennych racjach pokarmowych, natomiast nie wpłynęła na zmianę spożycia pozostałych składników, jak również na zmianę wskaźników antropometrycznych ani na wartość wskaźników morfologicznych i poziom glukozy we krwi. W wyniku 6-tygodniowego spożywania śliwek suszonych, u badanych osób, istotnie zmniejszył się poziom cholesterolu ogółem (o 10%) oraz jego frakcji LDL (o 15%), jak również wskaźnik aterogenności LDL/HDL (o 22%). W oparciu o korzystną zmianę profilu lipidowego we krwi pacjentów stosujących dietę z udziałem suszonych śliwek odmiany

‘Valor’, uznano, że produkt ten wykazuje oddziaływanie prozdrowotne u osób z umiarkowaną hipercholesterolemią.

Podsumowanie

Z uwagi na duże znaczenie śliwek w produkcji i przetwórstwie owoców w Polsce, ważne jest poznanie przebiegu procesów fizjologicznych i biochemicznych zachodzących w czasie dojrzewania i przechowywania tych owoców. Właściwy dobór odmiany, terminu zbioru i warunków przechowywania umożliwi ograniczenie strat surowca, a jednocześnie pozwala otrzymać owoce o dobrych właściwościach sensorycznych i odżywczych. Jedną z możliwości poprawy efektywności zagospodarowania zbiorów śliwek jest produkcja suszu, w znacznie większym, niż dotychczas, zakresie. Suszenie śliwek może być poprzedzone wstępnym odwadnianiem osmotycznym, co pozwala otrzymać produkt o korzystnych cechach sensorycznych. Suszone śliwki jako bogate źródło węglowodanów, związków mineralnych, błonnika pokarmowego i związków fenolowych, wykazują właściwości bioaktywne i dużą wartość żywieniową.

Porównując cechy fizykochemiczne i sensoryczne badanych śliwek za najbardziej przydatne do przechowywania uznano śliwki odmiany ‘Valor’, zaś najmniej śliwki odmian ‘Elena’ i ‘Valjevka’. Zbiór śliwek w pełni dojrzałych umożliwia uzyskanie owoców konsumpcyjnych o najwyższych walorach sensorycznych i żywieniowych. Jako owoce o dużej zawartości polifenoli i aktywności przeciwutleniającej wskazano śliwki ‘Čačanska Najbolja’, ‘Valor’, ‘Węgierka Zwykła’ i ‘Oneida’, zaś małej - ‘Elena’ i ‘Valjevka’. Śliwki suszone charakteryzowały się dużą zawartością błonnika całkowitego, a najwyższy poziom jego frakcji rozpuszczalnej stwierdzono w odmianach ‘Valor’ i ‘Oneida’. Najkorzystniejszą metodą suszenia śliwek stosowanych w badaniach, było suszenie konwekcyjne w temperaturze 80 °C, które pozwoliło otrzymać produkt o największej aktywności przeciwutleniającej i zawartości polifenoli. Suszone śliwki odmiany ‘Valor’, na podstawie korzystnej zmiany profilu lipidowego krwi pacjentów stosujących dietę z udziałem tego produktu, można uznać za żywność o właściwościach prozdrowotnych.

Efektem końcowym pracy, poprzez określenie przydatności owoców do suszenia i w żywieniu osób z zaburzeniami metabolicznymi, będzie promowanie śliwek suszonych jako tzw. „zdrowej” przekąski. Rezultaty badań powinny być rekomendacją dla rozwoju produkcji śliwek suszonych, a jednocześnie wskazują odmiany śliwek o najlepszych zdolnościach przechowalniczych, co ma duże znaczenie dla producentów.

4.2. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Początek mojej kariery naukowej był związany z Katedrą Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, gdzie pod kierunkiem prof. Włodzimierza Grajka zajmowałam się immobilizacją oraz modyfikacją błon plazmatycznych komórek drożdżowych w procesie fermentacji alkoholowej. Celem modyfikacji składu lipidowego błon plazmatycznych była poprawa chemoodporności komórek drożdży podczas fermentacji. Modyfikacja ta polegała na wbudowaniu nienasyconych kwasów tłuszczowych do błon komórkowych, co miało wpływ na właściwości technologiczne mikroorganizmów. Głównym efektem tych badań było zwiększenie stężenia etanolu w brzeczkach fermentacyjnych w porównaniu z procesami prowadzonymi przez drożdże niemodyfikowane. Dodatkowym atutem tych badań było opracowanie technologii modyfikacji składu lipidowego błon biologicznych komórek immobilizowanych w kulkach żelu alginianowego. Namnożone komórki inkubowano wraz z dodatkiem kwasów tłuszczowych lub olejów roślinnych, fosfolipidów, steroli i emulgatorów przez 3-6 godzin, a następnie prowadzono proces immobilizacji metodą sieciowania w strukturze hydrożelu. W tym przypadku stwierdzono również jednoznaczny wzrost tolerancji drożdży na wysokie stężenia etanolu. Zastosowanie komórek immobilizowanych umożliwia prowadzenie hodowli mikrobiologicznych przy większym stężeniu komórek, stosując je wielokrotnie lub przez dłuższy czas w porównaniu z komórkami w systemie wolnym. Dzięki temu można osiągnąć oszczędność surowca, niższe koszty procesu i zwiększenie jego efektywności poprzez poprawę stabilności fizjologicznej i odporności mikroorganizmów na czynniki stresowe. Modyfikacja z użyciem kwasów tłuszczowych prowadzi do wzrostu płynności błon plazmatycznych mikroorganizmów, przez co zwiększa się odporność komórek na działanie rozpuszczalników organicznych, w tym przypadku alkoholu etylowego. Badanie te prowadzono w ramach tematu badawczego „Immobilizacja mikroorganizmów przemysłowych” (temat badań własnych 37/TŻ/71/W). Rezultatem tych badań były liczne publikacje i doniesienia na konferencjach krajowych i międzynarodowych (Austria) (A.1.1.; A.1.2.; A.3.1; A.5.3.; A.5.8.), zaś technologia modyfikacji mikroorganizmów w systemie immobilizowanym została opatentowana w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej jako opis patentowy pt.: Sposób modyfikacji właściwości technologicznych mikroorganizmów w systemie immobilizowanym (A.9.1.).

Drugim nurtem prac badawczych, w których brałam udział w tym okresie, były badania nad wpływem warunków hodowli, w tym aktywności wody, na fizjologię i

metabolizm mikroorganizmów. Badania te dotyczyły m.in. wpływu warunków hodowli na efektywność wzrostu i sporulacji grzybów strzępkowych, na sekrecję enzymów i białek do podłoża. W części doświadczeń stosowano grzyby strzępkowe w systemie komórek immobilizowanych na piankach poliuretanowych. Badania te realizowano w ramach tematu „Doskonalenie metod hodowli mikroorganizmów oraz produkcji metabolitów i preparatów mikrobiologicznych” (temat 256/93 S). Z realizacją tych badań związany był krótkoterminowy staż naukowy w ośrodku INA-INRA Paris-Grignon (Narodowy Instytut Badań Rolniczych) (Francja, 1992). Rezultaty opisanych wyżej badań były przedstawione na konferencjach naukowych (A.4.1.; A.5.1.; A.5.2.).

Kolejnym realizowanym przeze mnie tematem badawczym pod kierownictwem prof. Włodzimierza Grajka, były badania procesu ciągłej fermentacji mlekowej, które prowadzono we współpracy z przedsiębiorstwem Akwawit w Lesznie oraz duńską firmą Bioscan AS. Celem badań była innowacyjna technologia produkcji kwasu mlekowego przez zastosowanie reaktora membranowego, który umożliwił prowadzenie fermentacji w systemie ciągłym z recyrkulacją komórek bakteryjnych, dzięki czemu uzyskano wysokie stężenia biomasy komórkowej i zwiększoną produktywność objętościową bioreaktora. Przedmiotem badań było opracowanie składu pożywki fermentacyjnej i optymalizacja procesu ciągłej fermentacji w reaktorze membranowym oraz dążenie do powiększenia skali procesu, z półtechnicznej do przemysłowej. Zastosowanie technik membranowych obejmowało sterylizację brzezki, fermentację w bioreaktorze membranowym, separację bakterii na drodze mikrofiltracji oraz oczyszczanie kwasu mlekowego metodą elektrodializy membranowej. Wyniki tych badań wskazują na możliwość wielokrotnego zwiększenia produktywności bioreaktorów w porównaniu z tradycyjną technologią fermentacji. Badania prowadzono w ramach tematu pracy umownej „Oczyszczanie brzeczek fermentacyjnych przy pomocy ultrafiltracji” (temat 57/91).

W tym czasie byłam również zaangażowana w prace badawcze nad denitryfikacją mikrobiologiczną soku z buraka ćwikłowego. Badania te uważam za najważniejsze w mojej działalności naukowo-badawczej jako asystenta, a zwieńczeniem badań było opracowanie rozprawy naukowej i uzyskanie na jej podstawie stopnia naukowego doktora. Obiektem badań nad denitryfikacją był sok z buraka ćwikłowego, bowiem warzywo to wykazuje wyraźną tendencję do gromadzenia jonów azotanowych (III) i (V), które mogą obniżać ich wartość żywnościową. Szkodliwość spożywania azotanów (V) związana jest z możliwością ich redukcji do azotanów (III), zarówno w przetwarzanej żywności, jak i w organizmie. W

światle badań z ostatnich lat, azotany (III) i (V) mogą wykazywać również korzystny wpływ na zdrowie. Azotanom (III) przypisuje się aktywność antybakteryjną wobec patogennych bakterii żołądkowo-jelitowych. Najnowsze dane literaturowe dowodzą zaś, że wysokie pobranie azotanów (V) korzystnie oddziałuje na funkcjonowanie mózgu osób starszych, zwiększa tolerancję wysiłkową i wytrzymałość fizyczną organizmu. Jednakże wiadomym jest również, że azotany (III) wywołują methemoglobinemię, chorobę szczególnie niebezpieczną dla niemowląt, polegającą na blokowaniu wiązania tlenu przez hemoglobinę, zaś zredukowane azotany stanowią czynnik nitrozujący w tworzeniu nitrozoamin, wykazujących działanie rakotwórcze i mutagenne. Zgodnie z zaleceniami Komitetu Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności, należy kontrolować ilość azotanów (V) nie tylko w żywności, zwłaszcza tej specjalnego przeznaczenia, ale też w preparatach barwiących. Wskazuje to na konieczność kontrolowania poziomu azotanów w burakach przeznaczonych do bezpośredniej konsumpcji, ale również tych do produkcji barwników spożywczych. Celem badań było usunięcie azotanów (V) z soku buraczanego, a jednocześnie otrzymanie produktu o korzystnych, możliwych do zaakceptowania cechach sensorycznych. Cel podjęty w badaniach był bardzo trudnym zadaniem z uwagi na złożony skład chemiczny soku, którego składniki łatwo ulegają przemianom. Dotyczy to np. barwników betalainowych, których stężenie i wzajemne proporcje ilościowe decydują o barwie surowca i jego przetworów. Skuteczną metodą usuwania azotanów (V) z soku buraczanego okazała się mikrobiologiczna denitryfikacja z użyciem bakterii. Równolegle prowadziłam też badania nad możliwością obniżania zawartości jonów azotanowych (V) na drodze ich asymilacji do budowy białka komórkowego, stosując kultury zawiesinowe grzybów jadalnych, jak *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* czy *Agaricus bisporus*. Ideą takiego rozwiązania było otrzymanie soku o aromacie grzybowym, wolnego od azotanów (V) jako półproduktu do przygotowania barszczu buraczanego. Jednak rezultaty doświadczeń nie były zadowalające, gdyż w wyniku 3-dniowej hodowli, ubytek azotanów (V) wyniósł jedynie 19-25%, przy znacznym pogorszeniu cech sensorycznych i ubytku suchej masy w soku buraczanym. Znacznie korzystniejsza okazała się beztlenowa dysymilacyjna redukcja azotanów (V) poprzez azotany (III) do azotu gazowego, z wykorzystaniem bakterii denitryfikacyjnych. Najlepsze wyniki, spośród ośmiu badanych gatunków bakterii, uzyskano w przypadku zastosowania szczepów *Paracoccus denitrificans* i *Ochrobactrum antropi*, dla których stwierdzono całkowitą redukcję azotanów (V) w hodowlach 24- lub 48-godzinnych, w zależności od stężenia inokulum. Prowadząc denitryfikację przy zwiększonej gęstości komórek (do 10 g biomasy/l pożywki) możliwe było skrócenie czasu redukcji azotanów (V) do kilku godzin, przy początkowym ich poziomie w

soku około 5 g/l. W wyniku skrócenia czasu denitryfikacji, ograniczono straty suchej masy, jak również zmiany cech sensorycznych i straty zawartości barwników betalainowych, w soku buraczanym po hodowli. Dodatkowo, w celu poprawy smaku i zapachu soku po mikrobiologicznej denitryfikacji, usuwano związki lotne na drodze odparowania. Komórki bakteryjne usuwano stosując mikrofiltrację przepływową lub wykorzystując do procesu bioreaktor membranowy z systemem zwracania komórek. Najważniejsze wyniki moich prac badawczych nad denitryfikacją stanowiły przedmiot rozprawy doktorskiej pt.: „Mikrobiologiczna denitryfikacja soku z buraka ćwikłowego”, której promotorem był prof. dr hab. Janusz Czapski. Cykl badań nad mikrobiologiczną denitryfikacją prowadzono w ramach takich tematów badawczych, jak: „Denitryfikacja soków warzywnych metodą mikrobiologiczną” (grant KBN nr 5 S 307 041 04 1994-1996), „Mikrobiologiczna denitryfikacja soku z buraka ćwikłowego” (temat 115/TŻ/71/W 1996-1998), „Denitryfikacja koncentratów soku z buraka ćwikłowego” (jako kontynuacja 115/TŻ/71/W 1999-2000). Najważniejsze wyniki tych badań zostały przedstawione w licznych publikacjach (A.1.3., A.1.4., A.1.5., A.1.6., A.3.2.) i doniesieniach na konferencjach krajowych i międzynarodowych (Francja) (A.5.4., A.5.5., A.5.6., A.5.7., A.5.9., A.5.10., A.5.11., A.5.12.).

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora rozpoczęłam pracę w Zakładzie Technologii Owoców i Warzyw Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, gdzie od 2001 zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta. Od tego czasu moja działalność naukowa koncentrowała się wokół czterech głównych problemów badawczych:

1. Ocena zmian zawartości azotanów(III) i (V), barwników betalainowych oraz właściwości sensorycznych soku z buraka ćwikłowego poddanego denitryfikacji lub fermentacji mlekowej.
2. Ocena zmian zawartości azotanów(III) i (V) w warzywach pakowanych w atmosferze modyfikowanej podczas przechowywania.
3. Ocena stabilności barwy i barwników naturalnych w przetworach owocowych i warzywnych podczas ogrzewania i przechowywania.
4. Ocena zmian zawartości związków bioaktywnych w śliwkach podczas dojrzewania, przechowywania i suszenia.

Ad. 1. Badania nad denitryfikacją stanowiły kontynuację doświadczeń prowadzonych przed uzyskaniem stopnia doktora. W tym etapie szczególną uwagę zwrócono na problematykę związaną z badaniem zmian zawartości barwników betalainowych oraz zmian cech sensorycznych soku buraczanego po mikrobiologicznej denitryfikacji. Jako bakterie denitryfikujące stosowano szczep *Paracoccus denitrificans*, który jest powszechnie uważany na bezpieczny dla zdrowia człowieka. Zrezygnowano natomiast, mimo najwyższej aktywności denitryfikacyjnej wśród wcześniej badanych drobnoustrojów, ze szczepu *Ochrobactrum antropi*, z uwagi na opublikowane wówczas doniesienia o jego potencjalnej chorobotwórczości. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach, uzyskano całkowitą redukcję azotanów (V), bez nagromadzenia się szkodliwych azotanów (III) jako produktu pośredniego, przy wyjściowym poziomie azotanów (V) około 4g/l, w czasie 6-8 godzin, w zależności od wielkości inokulum. W sokach po hodowli następowało zmniejszenie zawartości barwników betacyjanowych, a zwiększenie betaksantynowych, co prowadziło do zmiany barwy w kierunku brązowo-czerwonej. Wzrost stężenia betaksantyn wynikał z zastosowanej metody analitycznej, w której brązowe produkty degradacji betalain są oznaczane jako barwniki żółte. Na podstawie badań modelowych metodą płaszczyzn odpowiedzi, stwierdzono, że największy wpływ na stabilność barwników w soku z buraka ćwikłowego podczas denitryfikacji miała dostępność tlenu i wartość pH, przy relatywnie niskim wpływie temperatury. Wartości pH soku w zakresie 7-8 były optymalne dla procesu redukcji azotanów (V), jednak nieodpowiednie dla stabilności barwników, dla których najkorzystniejsza jest wartość pH około 5. Wraz ze wzrostem dostępności tlenu zwiększał się stopień degradacji barwników. Smak i zapach soku z winno-buraczanego, po hodowli przyjmował nutę karmelową lub brzeczkową, niepożądaną. W związku z tym sok poddano zagęszczaniu, w wyniku czego odparowaniu uległo większość substancji lotnych, odpowiedzialnych za nieprzyjemny smak i zapach. Analiza metodą rozcieńczeń, soku po zagęszczaniu wykazała, że przy niskim udziale soku w badanym roztworze, smak i zapach były bardzo słabo wyczuwalne. W końcowym rezultacie uzyskano więc produkt wolny od azotanów (V), o akceptowalnych cechach sensorycznych, co umożliwia zastosowanie go do barwienia żywności lub produkcji preparatów barwiących.

Kolejnym zagadnieniem związanym z denitryfikacją było poszerzenie badań nad możliwością usuwania azotanów z zagęszczonego soku z buraka ćwikłowego. W praktyce bowiem sok ten jest wytwarzany i przechowywany najczęściej w formie koncentratu, zachowując wysoką stabilność mikrobiologiczną i chemiczną. Skuteczna denitryfikacja koncentratu buraczanego przyniosłaby wymierne efekty zmniejszenia kosztów procesu, dzięki

kilkukrotnemu zmniejszeniu objętości surowca. Zastosowanie do denitryfikacji koncentratu soku buraczanego powszechnie stosowanego i wykorzystanego we wcześniejszych doświadczeniach szczepu *Paracoccus denitrificans*, nie przyniosło zadowalających efektów. W wyniku 72-godzinnej hodowli w dwukrotnie rozcieńczonym koncentracie (2150 mOsm/kg, 36% s.m.) stopień redukcji azotanów (V) wyniósł zaledwie 24%. Wraz ze zmniejszaniem ciśnienia osmotycznego poprzez dalsze rozcieńczanie koncentratu, stwierdzono efektywniejszą denitryfikację, ale jednocześnie większe straty suchej masy soku i większe przyrosty biomasy komórkowej. Dlatego podjęto badania nad denitryfikacją zagęszczonego soku z buraka ćwikłowego z wykorzystaniem bakterii halofilnych, takich jak *Halobacterium mediteranei*, *Halobacterium denitrificans* oraz *Micrococcus halobius*. Denitryfikacji poddano koncentrat soku (3600 mOsm/kg) oraz jego roztwory 2- i 3-krotnie rozcieńczone (1800 i 1200 mOsm/kg) w czasie 48 godzin, przy początkowym stężeniu azotanów (V) powyżej 7g/l, przy którym nie rośnie większość drobnoustrojów. Bakterie halofilne wymagają do wzrostu dużego stężenia soli w podłożu, przeciętnie 2-4M NaCl czyli około 100-200 g/l i tolerują wysokie stężenia azotanów. W wyniku 48 godzinnej hodowli bakterii halofilnych, zawartość azotanów (V) w koncentracie obniżyła się od 20% w przypadku *Halobacterium mediteranei* do 37% w przypadku *Micrococcus halobius*. W koncentracie rozcieńczonym stopień redukcji azotanów (V) był większy. Przy dwukrotnym rozcieńczeniu stwierdzono ubytek azotanów (V) w zakresie 32–59%, zaś w trzykrotnie rozcieńczonym koncentracie od 56 do 75%. W każdym wariantcie hodowlanym najwyższy stopień denitryfikacji odnotowano w przypadku bakterii *Micrococcus halobius*. W wyniku denitryfikacji prowadzonej przy pH około 7, optymalnym dla aktywności stosowanych bakterii, podobnie jak we wcześniejszych badaniach, stwierdzono spadek stężenia betacyjaninów (o 30-60%) i wzrost betaksantyn i/lub produktów degradacji betalain oznaczanych łącznie jako barwniki żółte (o 5-30%). W koncentracie stopień degradacji barwników był mniejszy niż w roztworach rozcieńczonych, a zmiana tonu barwy mniej widoczna, również z powodu dużego natężenia barwy i stężenia barwników, które maskowały zachodzące zmiany. W wyniku fermentacji z użyciem bakterii halofilnych w soku nastąpiły niekorzystne zmiany smaku, a zwłaszcza zapachu. Zatem przed zastosowaniem otrzymanego produktu do barwienia żywności, oprócz usunięcia komórek bakteryjnych, należałoby zastosować wyżej opisaną metodę odparowania związków lotnych odpowiedzialnych za obcy smak i zapach. Reasumując stwierdzono, że zastosowanie bakterii halofilnych pozwoliło usunąć w czasie 48 h do 75% azotanów w koncentracie dwukrotnie rozcieńczonym (1200 mOsm/kg), lecz tylko do 37% w wyjściowym koncentracie (3600 mOsm/kg). Można sądzić, że przedłużenie czasu trwania mikrobiologicznej denitryfikacji

stosowanych koncentratów soku buraczanego pozwoliłoby na zwiększenie stopnia redukcji azotanów, jednak ze względu na postępujące jednocześnie zmiany stężenia barwników betalainowych i tonu barwy, czas hodowli należy ograniczyć do niezbędnego minimum. Powyższy cykl badawczy realizowano w ramach tematu badań własnych „Wykorzystanie soku z buraka ćwikłowego po mikrobiologicznej denitryfikacji dla celów spożywczych” (115/TŻ/71/W). Najważniejsze rezultaty tych badań przedstawiono w publikacjach (B.1.1.; B.1.2.; B.1.34.) i w doniesieniu konferencyjnym (B.5.1.). Owocem całego cyklu badań nad mikrobiologiczną denitryfikacją był także Opis Patentowy w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej pt.: Sposób denitryfikacji płynnych produktów spożywczych, zwłaszcza soków i/lub homogenatów warzywnych, metodą mikrobiologiczną (B.9.1.).

Równolegle z badaniami nad mikrobiologiczną denitryfikacją soku z buraka ćwikłowego, prowadziłam też doświadczenia nad zmianami zawartości azotanów(V) i barwników oraz oceną sensoryczną i mikrobiologiczną soku buraczanego poddanego fermentacji mlekowej. Świeży sok z buraka ćwikłowego jest mało atrakcyjny smakowo ze względu na obecność geosminu, który nadaje mu ziemisty posmak. Jednak na drodze zakwaszenia i zagęszczenia soku, można znacznie poprawić jego cechy sensoryczne. W praktyce, od stuleci wykorzystuje się zakwaszenie soku buraczanego na drodze spontanicznej fermentacji mlekowej podczas przygotowywania tradycyjnej polskiej zupy – barszczu buraczanego na zakwasie. Jednak zastosowanie takiej metody na skalę przemysłową wymagałoby zastosowania kultur starterowych dla zapewnienia standaryzacji produkcji. Napojem regionalnym w Polsce jest też kiszony sok z buraka ćwikłowego. Celem prowadzonych badań było otrzymanie i ocena jakości naturalnych zakwasów buraczanych, w zależności od zastosowanej metody inokulacji surowca, jako produktu do przyrządzania tradycyjnego barszczu. Porównywano tu dwie metody przygotowywania zakwasu, tradycyjną z dodatkiem kromki żytniego chleba oraz metodę z użyciem kultury starterowej *Lactobacillus plantarum*, wobec próby kontrolnej bez żadnych dodatków. W zakwasie z dodatkiem czystej kultury bakteryjnej, najszybciej następowało obniżenie wartości pH produktu. W próbach tych stwierdzono większą liczbę bakterii mlekowych, a mniejszą komórek drożdży w porównaniu z pozostałymi zakwasami. W trakcie 4-dniowej fermentacji, w wyniku wymywania barwników z plasterów buraka do zalewy, w zakwasie zwiększał się stosunek ilościowy barwników czerwonych do żółtych, z 0,5 do 3,7 i 4,5, w próbach z chlebem i inokulum odpowiednio. Wysoki współczynnik zawartości betacyjanów do betaksantyn oraz niskie pH (3,7-3,9) wpłynęły na korzystny, czerwono-fioletowy ton barwy produktu. Miało to

odzwierciedlenie w wartościach parametrów barwy w systemie CIE L*a*b*. Podczas fermentacji jasność L* zmniejszała się, zaś udział czerwonej barwy (a*) i nasycenie (C*) zwiększały się. Ocenie sensorycznej poddano próby zakwasów o temperaturze 4°C oraz po zagotowaniu z dodatkiem wyciągu tradycyjnych przypraw roślinnych. W zakwasach zimnych dominował mało atrakcyjny, kwaśny, ziemisty i mdły smak oraz zapach. W próbach ogrzanych, w wyniku odparowania substancji lotnych oraz dodatku przypraw, stwierdzono poprawę cech sensorycznych, zanik nuty ziemistej i mdłej. Ogrzewanie wpłynęło na zmianę tonu barwy zakwasu z fioletowego na czerwony. Na podstawie oceny sensorycznej, wszystkie zakwasy, bez względu na sposób fermentacji, uznano za przydatne do przygotowania barszczu. W próbkach z dodatkiem chleba i kontroli obecne były niewielkie ilości azotanów (III) (do 0,2 mg/kg), a zawartość azotanów (V) odnotowana we wszystkich próbach na poziomie 250-300 mg/kg nie stwarza zagrożenia dla zdrowia konsumenta. Najważniejsze wyniki cyklu badań nad jakością zakwasu buraczanego przedstawiono w publikacjach (B.1.4.; B.1.7.; B.1.8.) i w komunikatach konferencyjnych, z których jeden otrzymał wyróżnienie podczas konferencji PTTŻ „Żywność regionalna na tle współczesnych trendów produkcji żywności w Polsce i w Europie” (B.5.4.; B.5.8.).

Ad. 2. Kolejnym nurtem badawczym w mojej działalności naukowej była problematyka jakości warzyw mało przetworzonych pakowanych w atmosferze modyfikowanej. Doświadczenia prowadzono z wykorzystaniem warzyw liściowych, jak sałata, szpinak, jarmuż, pietruszka naciowa, a także rzodkiewki i sałatki coleslaw. Azotany (V) są naturalnym składnikiem roślin pobieranym z gleby do syntezy białek. Jednak nadmierna ich ilość może się kumulować w tkankach, a następnie ulegać redukcji do potencjalnie szkodliwych azotanów (III) podczas przetwarzania, przechowywania i po spożyciu w przewodzie pokarmowym. Jak wcześniej wspomniano, azotanom (III) przypisuje się zarówno działanie szkodliwe, jak i korzystne dla zdrowia. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że warzywa stanowią istotny składnik diety niemowląt, dzieci oraz osób starszych i chorych, należy kontrolować stężenie tych jonów w surowcach. Oprócz warzyw korzeniowych (burak ćwikłowy, rzodkiewka, marchew), tendencje do kumulowania nadmiernych ilości azotanów (V) wykazują też warzywa liściowe, zwłaszcza te o krótkim okresie wegetacji oraz uprawiane w szklarniach, gdzie hodowlę prowadzi się przy niedostatecznym oświetleniu, wysokim nawożeniu i w krótszym czasie niż na polu. Takie warunki sprzyjają pobieraniu dużej ilości soli azotowych, a niedobór światła i krótka wegetacja ogranicza intensywność fotosyntezy, podczas której azotany (V) ulegają redukcji i włączeniu w cząsteczki białek. W badanym

szpinaku zawartość azotanów (V) wynosiła 500-1400 mg/kg, była więc wysoka, ale nie przekraczała dopuszczalnych poziomów dla tego warzywa. W trakcie przechowywania stężenie tych jonów najczęściej zmniejszało się. Na zawartość azotanów (V) wpływał też termin uprawy. W szpinaku ze zbiorów jesiennych stwierdzono 2-3-krotnie wyższy poziom tych jonów niż w szpinaku wiosennym, kiedy występuje większe nasłonecznienie i aktywność fotosyntezy. Przemiany azotanów (III) i (V) badano w warzywach pakowanych i przechowywanych w atmosferze modyfikowanej. Taka metoda pakowania jest sposobem przedłużania trwałości mało przetworzonych owoców lub warzyw, będących rodzajem żywności wygodnej do bezpośredniego spożycia lub przyrządzenia potrawy. Poprzez skład atmosfery gazowej w opakowaniu można ograniczyć procesy fizjologiczne, mikrobiologiczne i biochemiczne w pakowanym surowcu. Skład atmosfery wpływa m.in. na przemiany azotanów (III) i (V). W badanych świeżych warzywach nie stwierdzono obecności azotanów (III), ale powstawały one podczas przechowywania, w zależności od warunków pakowania.

Badania związane z oceną zawartości azotanów (III) i (V) podczas przechowywania warzyw pakowanych w atmosferze modyfikowanej wykonywałam m.in. w ramach tematu „Wpływ atmosfery modyfikowanej na jakość sensoryczną i mikrobiologiczną oraz zmiany związków biologicznie aktywnych w jarmużu (*Brassica oleracea L. var. acephala DC*) o małym stopniu przetworzenia” (grant MNiSW nr N N312 2193 33, kierownik - dr inż. R. Biegańska-Marecik). Celem tej pracy było określenie wpływu składu atmosfery i rodzaju materiału opakowaniowego na jakość sensoryczną i właściwości fizykochemiczne jarmużu o małym stopniu przetworzenia. W pakowanym i przechowywanym surowcu badano m.in. jakość mikrobiologiczną, zawartość związków bioaktywnych i aktywność przeciwutleniającą. Mój udział w realizacji wymienionego projektu badawczego dotyczył prac nad oceną wpływu pakowania i przechowywania jarmużu na zawartość azotanów (III) i (V). Jarmuż jest zaliczany do warzyw liściowych, mimo to nie gromadzi azotanów (III) i (V), gdyż jest uprawiany zawsze w warunkach polowych, gdzie pozostaje do późnej jesieni. Jest więc bezpieczny pod względem zawartości azotanów (III) i (V), podobnie jak warzywa będące botanicznymi owocami, np. pomidor czy papryka. W jarmużu świeżym nie stwierdzono obecności azotanów (V) i (III). Podczas przechowywania odnotowano niską zawartość azotanów (V), około 100-150 mg/kg ś.m., stąd tworzące się przejściowo azotany(III) były również na bardzo niskim poziomie (kilka mg/kg). Najwięcej azotanów (V) i (III) odnotowano w próbach przechowywanych w MA o małej zawartości tlenu (2-10%). Dla porównania w szpinaku świeżym zawartość azotanów (V) wynosiła 1000-1200 mg/kg ś.m., przy ADI dla przeciętnego człowieka na poziomie 350 mg/dobę. Podczas przechowywania

tego surowca w atmosferze zawierającej 2-10% tlenu oraz w powietrzu stwierdzono wysoki poziom azotanów (III), ponad 100-200 mg/kg produktu, co wskazuje na ryzyko jego spożycia (wg WHO ADI = 0,13 mg NO₂⁻/kg masy ciała czyli około 13 mg NaNO₂ dla przeciętnego człowieka). Wyniki te potwierdzają, że nie należy pakować i przechowywać szpinaku i innych warzyw w opakowaniach z niską początkową zawartością tlenu, jak też cechujących się dużą barierowością. Zastosowanie atmosfery o dużej zawartości tlenu, folii o dużej przepuszczalności dla tlenu lub z mikroperforacją do pakowania jarmużu korzystnie wpływało również na jego jakość sensoryczną oraz pozwoliło zachować najwyższy poziom polifenoli, karotenoidów i aktywności przeciwutleniającej po 12-dniowym przechowywaniu.

Zmiany stężenia azotanów (III) i (V) badałam również biorąc udział w realizacji projektu „Zmiany zawartości związków aktywnych biologicznie oraz jakości sensorycznej i mikrobiologicznej w mało przetworzonej sałatce warzywnej na bazie kapusty białej (*Brassica oleracea L. spp. Olearacea convar capitata*) pakowanej w atmosferze modyfikowanej” (grant MNiSW nr N N312 151134, kierownik - dr inż. E. Radziejewska-Kubzdela). Celem projektu było wydłużenie trwałości sałatki coleslaw, przy zapewnieniu dobrej jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego oraz określenie wpływu warunków pakowania w atmosferze modyfikowanej na zmiany zawartości związków bioaktywnych i aktywność przeciwutleniającą produktu. W świeżej surówce coleslaw (kapusta 80%, marchew 20%) zawartość azotanów (V) wynosiła 325 mg/kg ś.m. Do pakowania produktu zastosowano folię o przepuszczalności tlenu 35 cm³/m²/24h*atm z mikroperforacją oraz atmosferę powietrza lub modyfikowaną o składzie procentowym O₂/CO₂/N₂: 5/10/85; 20/25/55; 50/30/20; 70/30/0. W czasie przechowywania badanych prób odnotowano istotny spadek zawartości azotanów (V). Po 12 dniach przechowywania najniższą zawartość wyżej wymienionych związków stwierdzono w próbach zapakowanych w atmosferze powietrza (36 mg/kg ś.m.) W pozostałych surówkach zawartość azotanów (V) była wyższa i wynosiła od 78 do 124 mg/kg ś.m. W badanych próbach nie odnotowano obecności azotanów (III), choć we wcześniejszych doświadczeniach były one obecne w próbach zapakowanych w folię nieperforowaną, o przepuszczalności dla tlenu 1900 cm³/m²/24 h *atm, ze względu na wytworzenie się w tych opakowaniach warunków beztlenowych. Najkorzystniejszym sposobem przedłużania trwałości badanej surówki było zastosowanie wstępnego moczenia surowców w roztworach kwasu askorbinowego lub cytrynowego oraz pakowanie z użyciem folii z mikroperforacją i atmosfery o składzie: 70/30/0 [%O₂/%CO₂/%N₂], co pozwoliło na zachowanie dobrej jakości sensorycznej i mikrobiologicznej oraz największej zawartości polifenoli w czasie 12 dni przechowywania w temperaturze 4°C. Otrzymano produkt bezpieczny dla zdrowia pod

względem mikrobiologicznym i zawartości azotanów, bowiem przeciętne spożycie sałatki w ilości około 500 g nie przekracza ADI tych związków dla dorosłego człowieka (WHO).

Badania w zakresie zmian zawartości azotanów (III) i (V) w mało przetworzonych warzywach kontynuowano również dla innych surowców. Przechowując sałatę masłową w atmosferze o dużej zawartości tlenu (50 i 80%), ale zamkniętej folią o niskiej przepuszczalności dla tlenu ($35 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}\cdot\text{bar}$), stwierdzono obecność azotanów (III), na skutek zwiększenia udziału ditlenku węgla w opakowaniu. Podobne były rezultaty badań nad pakowaną w atmosferze modyfikowanej rzodkiewką, gdzie zastosowanie folii o wysokiej przepuszczalności tlenu ($3000 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}\cdot\text{bar}$) pozwoliło zachować warunki tlenowe w atmosferze wewnątrz opakowania, dobrą jakość sensoryczną i uniknąć gromadzenia azotanów (III) w czasie 12 dni przechowywania w porównaniu z użyciem folii o niskiej przepuszczalności tlenu ($200 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}\cdot\text{bar}$). Świeża pietruszka naciowa charakteryzowała się niską zawartością azotanów (V) (33 mg/kg ś.m.), jednak w wyniku 12 dni przechowywania w opakowaniu z folii o przepuszczalności tlenu $1500 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}\cdot\text{bar}$ i początkowej zawartości tlenu w atmosferze 3%, nastąpił wzrost stężenia azotanów (V) do około 300 mg/kg produktu oraz znaczne pogorszenie jakości. Zastosowanie atmosfery o wysokim stężeniu tlenu (50 i 80%), lecz folii o niskiej przepuszczalności ($60 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}\cdot\text{bar}$) skutkowało spadkiem zawartości azotanów (V). W żadnej próbie przechowywanej pietruszki nie stwierdzono obecności azotanów (III). Przeprowadzone doświadczenia pozwalają stwierdzić, że niska zawartość tlenu w opakowaniu, sprzyja gromadzeniu azotanów (III) i pogorszeniu cech sensorycznych badanych surowców. Najlepszą jakość pakowanych i przechowywanych warzyw uzyskano z wykorzystaniem folii z perforacją i/lub wysoką przepuszczalnością dla tlenu. Stwierdzono, że wysokie stężenie azotanów (V) w surowcu zwiększa prawdopodobieństwo wytwarzania się niebezpiecznej dla zdrowia ilości azotanów (III) w produkcie pakowanym i przechowywanym. Rezultatem tego cyklu badawczego są liczne publikacje (B.1.6.; B.1.16.; B.1.17.; B.1.20.; B.1.25.; B.1.27.; B.1.28.; B.1.30.) i doniesienia na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym (B.5.13.; B.5.14.; B.5.20.; B.5.22.; B.5.24.; B.5.31.; B.5.36.; B.5.37.; B.5.38.).

Ad. 3. Moje zainteresowania badawcze obejmowały również problematykę stabilności oraz kształtowania barwy i zawartości naturalnych barwników w przetworach owocowych i warzywnych podczas obróbki termicznej i przechowywania. Barwa żywności pełni ważną rolę w jej promocji i reklamie, akceptacji przez konsumenta oraz w postrzeganiu innych cech sensorycznych, jak smak, zapach i tekstura. Dane literaturowe potwierdzają, że przy ocenie

smaku i zapachu produktu konsument sugeruje się barwą, a jej utrata lub zmiana kojarzy się z pogorszeniem pozostałych cech sensorycznych. O barwie produktu decydują surowiec, technologia oraz warunki przechowywania, a w przypadku dodatku barwników również ich rodzaj i stabilność. Przedmiotem tych badań były przemiany antocyjanów i betalain w aspekcie ich wykorzystania jako barwników do produktów żywnościowych.

Zasadniczym celem omawianego cyklu badań było opracowanie metodyki prognozowania zmian barwy w czasie ogrzewania i przechowywania produktów zawierających barwniki antocyjanowe lub betalainowe. Celem doświadczeń było też określenie modelu zmian zawartości barwników i parametrów barwy produktów otrzymanych z różnych surowców owocowych lub warzywnych, a także ocena zależności między sensoryczną a instrumentalną oceną barwy. Z uwagi na bardzo złożony wpływ różnych czynników na zmiany barwy i barwników naturalnych, doświadczenia w tym zakresie prowadziłam z zastosowaniem układów modelowych, które umożliwiają przeprowadzenie wieloczynnikowych analiz w kontrolowanych warunkach procesu. Jako układy modelowe wykorzystano wodne, zbuforowane roztwory soków, koncentratów soków lub preparatów barwników, m.in. z winogron czerwonych, aronii, borówki czernicy, czarnej porzeczki, jeżyny, czarnego bzu, marchwi purpurowej, hibiskusa, czerwonej kapusty oraz buraków ćwikłowych. Większość doświadczeń przeprowadzono metodą optymalizacji z wykorzystaniem płaszczyzn odpowiedzi. Jako czynniki doświadczalne (zmiennie niezależne) przyjęto wartość pH roztworów, czas i temperaturę ogrzewania bądź przechowywania oraz stężenie wyjściowe barwników, a w wybranych seriach badań także wpływ kwasu askorbinowego, sacharydów, dostępności światła i tlenu. Jako zmiennie zależne (odpowiedzi) oceniano stężenie barwników, parametry barwy w układzie CIE $L^*a^*b^*$ lub CIE $L^*C^*h^*$ oraz wyróżniki oceny sensorycznej barwy (natężenie, naturalność, pożądalność). W badaniach stosowano plan Box-Behnkena, czynnikiowy-3-poziomowy i centralnie złożony dla trzech lub czterech czynników doświadczalnych, wykorzystując program komputerowy Design-Expert. Do analizy zależności między instrumentalną a sensoryczną oceną barwy wykorzystano sieci neuronowe. Zawartość barwników mierzono metodą HPLC oraz spektrofotometrycznie. Tak zaprojektowany zakres badań umożliwił określenie kinetyki zmian ilościowych barwników, ale także modelu zmian barwy pod względem jakościowym.

Analizując badane roztwory antocyjanów stwierdzono, że ich stężenie i stabilność barwy były zależne od surowca czyli od rodzaju i budowy występujących barwników. Największą stabilność podczas ogrzewania, na podstawie okresu półtrwania antocyjanów, wykazywały roztwory barwników z czerwonej kapusty i marchwi purpurowej, a więc

zawierających antocyjany acylowane, a najmniejszą roztwory barwników z jeżyny, hibiskusa i aronii. Zmniejszenie zawartości antocyjanów w większości skutkowało wzrostem wartości składowych X, Y, Z, lecz często, np. dla aronii czy enocyjaniny, wartości Z lub wszystkich składowych zmniejszały się w pH 5, co związane było z powstawaniem brązowych barwników. Dla większości prób podczas ogrzewania jasność barwy L* i udział czerwonej barwy a* zmniejszały się, a udział barwy żółtej b* zmniejszał się przy pH 3, zaś zwiększał się przy pH 4-5. Na skutek ogrzewania, wraz ze wzrostem poziomu czynników (pH: 3-5, czas: 0-240 min i temperatura: 70-90°C), nasycenie barwy C* zmniejszało się, a wartość kąta tonu barwy h* zwiększała się w kierunku barwy żółtej. Zmiany te odpowiadają pojaśnieniu barwy, spadkowi udziału barwy czerwonej, a wzrostowi barwy żółtej i brązowej. Bardzo wyraźny był wpływ odczynu środowiska na zmiany parametrów barwy: im wyższe pH tym większe zmiany natężenia i tonu barwy. Różnice tonu barwy widoczne były też w próbach nieogrzewanych o różnej wartości pH, co związane jest ze zmianą formy kationu flawyliowego w zależności od odczynu. Odzwierciedleniem tego były wartości współczynnika różnicy barwy ΔE , które przy pH 5 były największe dla czerwonej kapusty i marchwi purpurowej, mimo dużej stabilności tych barwników. Na podstawie wartości współczynników równań powierzchni odpowiedzi, największy wpływ na badane parametry miało początkowe stężenie barwników w roztworze (5-20 mg/100ml), a następnie czas ogrzewania. Najbardziej wrażliwe na wzrost czasu i temperatury ogrzewania były barwniki z aronii, a najmniej barwniki czarnego bzu, czerwonej kapusty i marchwi purpurowej. W przypadku dwóch ostatnich roztworów zaznaczył się największy wpływ pH na straty barwników. Odczyn środowiska miał bardzo istotny wpływ również na składowe barwy, zwłaszcza na wartości Z, które odzwierciedlają zmiany barwy brązowej. Analogiczne zależności stwierdzono podczas przechowywania roztworów barwników, w zależności od pH (3-5), czasu (0-20 dni) i temperatury (10-30°C) przechowywania oraz stężenia barwników (5-20 mg/100ml). W czasie przechowywania najbardziej stabilne były barwniki z czerwonej kapusty, a najmniej z aronii, hibiskusa i enocyjanina. W przypadku roztworów barwników z czerwonej kapusty odnotowano również najmniejsze wartości współczynników równań dla składowych i parametrów barwy, co wskazuje, że próby te charakteryzowały się największą stabilnością barwy w czasie przechowywania. Jednak, analogicznie jak podczas ogrzewania, przy pH 5 roztwory barwników z czerwonej kapusty cechowały się bardzo zmienioną, niepożądaną barwą. Podobnie dla pozostałych prób, w roztworach o najwyższym pH odnotowano najniższe noty oceny sensorycznej barwy. W tym względzie, najkorzystniej oceniono przechowywane roztwory z marchwi purpurowej, w których utrzymywał się

największy udział barwy czerwonej. W ocenie stabilności wybranych barwników analizowano również wpływ dodatku substancji mogących wykazywać działanie ochronne wobec antocyjanów. Mierząc stężenie antocyjanów w roztworach barwników z aronii podczas ogrzewania (pasteryzacja 15 min, 85°C) nie stwierdzono istotnego wpływu kwasu askorbinowego (0-100 mg/100 ml). Natomiast podczas przechowywania zaznaczył się wyraźnie ujemny wpływ kwasu askorbinowego na zawartość antocyjanów w badanych roztworach. Dodatek sacharozy (0-20 mg/100 ml) zwiększał stabilność barwników w roztworach z aronii i marchwi purpurowej podczas przechowywania, jednak wpływ cukru nie był statystycznie istotny. Naświetlenie prób roztworów antocyjanów skutkowało przyspieszeniem degradacji barwników, pojaśnieniem barwy i obniżeniem wartości parametru a^* , przy niewielkich zmianach parametru b^* . Dodatek azodyku sodu tylko w małym stopniu wpływał na stabilność barwników antocyjanowych, co wskazuje, że ich rozpad pod wpływem światła nie miał charakteru rodnikowego. W próbach naświetlanych, najmniej stabilne okazały się antocyjany w preparatach z czerwonych winogron czyli enocyjanina. Prowadząc badania nad wpływem dostępności tlenu na stabilność barwy i barwników w wyżej opisanych roztworach antocyjanów stwierdzono, że w warunkach tlenowych negatywny wpływ badanych czynników zwiększał się, powodując m.in. większą degradację barwników pod wpływem światła, kwasu askorbinowego, zmian wartości pH i temperatury podczas przechowywania. Podsumowując, wykorzystanie antocyjanów jako naturalnych barwników powinno dotyczyć jedynie żywności o niskim pH, co gwarantuje stabilną i pożądaną czerwoną barwę produktu. Produkty zawierające antocyjany, zarówno pochodzące z surowca, jak i wprowadzone w charakterze barwnika, należy pakować i przechowywać w warunkach bez dostępu światła i tlenu, najlepiej w niskiej temperaturze.

Stabilność barwników betalainowych oceniano w zależności od pH (3-6), czasu (5-100 min) i temperatury ogrzewania (70-90 °C). Na zawartość betalain oraz wartość parametrów barwy roztworów koncentratu z buraka ćwikłowego największy wpływ miała wartość pH. W wyniku ogrzewania następowało obniżenie zawartości betacyjanów, a wzrost betaksantyn, co związane jest z rozpadem barwników czerwonych do związków, które w stosowanej metodzie oznaczane są wraz z barwnikami żółtymi. Najmniejsze straty betacyjanów odnotowano dla wartości pH około 4,5. Podczas ogrzewania, wraz ze wzrostem czasu i temperatury, zmniejszał się stosunek zawartości barwników czerwonych do żółtych, co skutkowało zmianą tonu barwy z fioletowo-czerwonej do czerwonej lub brązowo-czerwonej. Najwyższą wartość wspomnianego współczynnika odnotowano przy pH 4,5, czyli przy największej stabilności betacyjanów. W tych też próbach stwierdzono najniższe wartości

X, Y, Z, L*, b* i h*, a najwyższe a* i C*. Podobnie jak w przypadku antocyjanów, większe straty betacyjanów obserwowano w próbach naświetlanych podczas przechowywania, w których następowała degradacja barwników zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, niezależnie od stosowanego dodatku ochronnego (kwas askorbinowy, azydek sodu). Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że stosowanie betalain jako barwnika do żywności jest najkorzystniejsze w przypadku produktów o słabo kwaśnym odczynie, na poziomie pH w granicach 4,5-5,5 oraz nie wymagających długotrwałej obróbki termicznej.

Oceniając przydatność sieci neuronowych do prognozowania jakości barwy roztworów antocyjanów na podstawie wyników analizy instrumentalnej, testowano różne rodzaje perceptronu wielowarstwowego. Jako dane wejściowe przyjęto składowe barwy X, Y, Z, a jako dane wyjściowe - noty oceny sensorycznej barwy. Sieć o trzech warstwach ukrytych po 15 neuronów pozwoliła najskuteczniej (na podstawie wartości RMSE oraz ilorazu odchylenia standardowego błędu do odchylenia standardowego danych doświadczalnych), spośród badanych sieci, przewidywać wartości natężenia, naturalności i pożądalności barwy. We wszystkich testowanych sieciach najniższą skuteczność stwierdzono w przypadku przewidywania pożądalności, a najwyższą dla natężenia.

Dla większości badanych odpowiedzi w układach modelowych uzyskano dopasowanie płaszczyzn 2 stopnia ($F < 0,0001$) i wysokie wartości R^2 , co wskazuje na bardzo dobre dopasowanie danych do równań. W większości prób otrzymano także nieistotny test braku dopasowania (dla $p > 0,05$), co umożliwia zastosowanie otrzymanych równań do przewidywania wartości odpowiedzi w badanym zakresie czynników. Testowane sieci neuronowe mogą być wykorzystane do przewidywania oceny jakości barwy na podstawie pomiarów instrumentalnych, co pozwoliłoby ograniczyć czasochłonne i obciążone subiektywizmem oceny sensoryczne.

Badania nad stabilnością barwy w przetworach owocowych poszerzono przeprowadzając cykl doświadczeń nad zmianami barwy i tekstury owoców restrukturowanych poddanych mrożeniu. Ocenie poddano analogi truskawek otrzymane metodą zestalenia wewnętrznego z wykorzystaniem przecieru owocowego i żelu alginianowego. Analizując parametry barwy owoców restrukturowanych po rozmrożeniu stwierdzono, że nastąpiło obniżenie wartości składowych X, Y i Z oraz parametrów L* i a*, a zwiększenie wartości b* w porównaniu z próbami przed mrożeniem. Takie zmiany świadczą o wzroście natężenia barwy i udziału barwy żółtej, a spadku udziału barwy czerwonej, co związane jest z brązowaniem enzymatycznym. Obniżeniu uległa także twardość owoców po rozmrożeniu. Obniżanie się oceny barwy i

tekstury, zarówno w analizie instrumentalnej, jak i sensorycznej, następowało wraz ze wzrostem udziału przecieru truskawkowego w owocach restrukturyzowanych. Wszystkie próby cechowały się korzystnym smakiem i zapachem w ocenie sensorycznej, a pomijając owoce z najwyższym udziałem wsadu truskawkowego (86%), także pożądaną barwą. Takie rezultaty badań świadczą o możliwości wykorzystania owoców restrukturyzowanych jako dodatków do lodów i deserów.

Opisane wyżej badania realizowałam jako główny wykonawca w projekcie pt.: „Prognozowanie zmian barwy w czasie ogrzewania i przechowywania produktów zawierających czerwone barwniki roślinne” (grant KBN 3 PO6T03522, kierownik - prof. dr hab. Janusz Czapski; 2002 – 2004 r.), jak również w ramach badań własnych „Wpływ przechowywania przetworów owocowych i warzywnych na zmiany barwy (190/TŻ/52/W, 2002-2007), których byłam kierownikiem. Ocenę skuteczności sieci neuronowych prowadziłam w ramach projektu: ”Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych" (Innowacyjna Gospodarka. POIG 01.01.02-00-061/09). Wyniki studiów nad stabilnością parametrów barwy i barwników zostały przedstawione w licznych publikacjach (B.1.3.; B.1.5.; B.1.9.; B.1.11.; B.1.15.; B.1.32.; B.1.33.) i komunikatach konferencyjnych (B.5.2.; B.5.3.; B.5.5.; B.5.6.; B.5.7.; B.5.9.; B.5.16.; B.5.29.; B.5.33.; B.5.34.; B.5.35.; B.5.44.).

Ad. 4. W ostatnich latach moje zainteresowania naukowo-badawcze poszerzyły się o problematykę oceny wpływu surowca, przetwarzania i przechowywania owoców na zawartość związków bioaktywnych i zdolność przeciwutleniającą. Głównym przedmiotem tych studiów były śliwki (*Prunus domestica*) z grupy węgierek. Najważniejsze cele, wyniki i wnioski tych badań zawarto w monografii (załącznik nr 8), którą uważam na swoje największe osiągnięcie i przedstawiam jako podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.). Wskazane osiągnięcie opisano syntetycznie w punkcie 4.1. niniejszego Autoreferatu.

Wstępne badania nad zdolnością przeciwutleniającą owoców prowadziłam z wykorzystaniem soków aroniowych, ponieważ owoce aronii i ich przetwory są bogatym źródłem polifenoli, w tym antocyjanów, i wykazują dużą aktywność przeciwutleniającą. Badania prowadzono w układzie modelowym. Sok aroniowy otrzymano poprzez rozcieńczenie koncentratu soku z użyciem roztworów buforowych tak, by wyjściowe stężenie antocyjanów wynosiło 20 mg/100 ml. Przygotowane roztwory pasteryzowano w zamkniętych

szklanych ampułkach i przechowywano zgodnie z planem doświadczenia. Jako czynniki doświadczalne analizowano wpływ wartości pH (3-5), temperatury (10-30°C) i czasu przechowywania (0-20 dni) roztworów koncentratu aroniowego, w warunkach tlenowych lub beztlenowych. Zarówno pasteryzacja, jak i przechowywanie wpłynęło na zmianę aktywności przeciwutleniającej roztworów aroniowych. Po pasteryzacji, w próbach ogrzewanych w warunkach tlenowych aktywność przeciwutleniająca była niższa o 40% w porównaniu z warunkami beztlenowymi. Podobne zależności stwierdzono po przechowywaniu. W próbach przechowywanych 20 dni w warunkach beztlenowych, zmniejszenie aktywności przeciwutleniającej wynosiło 7-35%, w zależności od temperatury i wartości pH, a w warunkach tlenowych od 64 do 80%, w porównaniu z próbami po pasteryzacji. Największy spadek aktywności przeciwutleniającej nastąpił w próbach o pH 5 przechowywanych w temperaturze 30 °C. Obniżanie się aktywności przeciwutleniającej było odzwierciedleniem zmniejszającej się zawartości barwników antocyjanowych w przechowywanych roztworach. Wyniki opisanych wyżej doświadczeń przedstawiono w publikacji i na konferencji naukowej (B.1.10.; B.5.10.).

Moje zainteresowanie owocami śliw różnych odmian jako źródła polifenoli i wykazujących stosunkowo dużą aktywność przeciwutleniającą trwa od 2006 r., kiedy rozpoczęłam pierwsze doświadczenia w tym kierunku. Następnie badania te kontynuowałam w ramach tematu „Wpływ stopnia dojrzałości, czasu przechowywania i suszenia na zmiany zawartości związków bioaktywnych śliwek (*Prunus domestica*) oraz ocena właściwości prozdrowotnych śliwek wybranej odmiany” (grant MNiSW nr N N312 1497 33; 2007-2010), których byłam kierownikiem. W celu poszerzenia potencjału badawczego, projekt realizowałam we współpracy z Katedrą Sadownictwa oraz Katedrą Higieny Żywnienia Człowieka Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Badania prowadzono łącznie przez kilka sezonów zbiorczych, oceniając zawartość polifenoli i aktywność przeciwutleniającą oraz właściwości sensoryczne świeżych owoców po zbiorze, następnie po przechowywaniu, a dla wybranych odmian także po odwadnianiu osmotycznym i suszeniu, w zależności od zastosowanej metody. Moje zainteresowania dotyczyły także praktycznego wykorzystania prozdrowotnych właściwości śliwek, czego wyrazem były badania z udziałem grupy pacjentów z zaburzeniami metabolicznymi. Pozytywnym wynikiem tych studiów było stwierdzenie istotnej poprawy profilu lipidowego krwi u badanych osób, spożywających śliwki suszone. Najważniejsze rezultaty opisanych badań zawarto w monografii, przedstawianej jako osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (załącznik 8; punkt 4.1. Autoreferatu). Wybrane wyniki kilkuletnich badań

nad zdolnością przechowalniczą, przydatnością do suszenia i właściwościami prozdrowotnymi śliwek przedstawiono w licznych publikacjach (B.1.12.; B.1.13.; B.1.14.; B.1.19.; B.1.21.; B.1.22.; B.1.23.; B.1.24.; B.1.26.; B.1.29.; B.1.31.; B.3.3.) i komunikatach na konferencjach krajowych (B.5.11.; B.5.15.; B.5.17.; B.5.18.; B.5.19.; B.5.21.; B.5.23.; B.5.25.; B.5.27.; B.5.28.; B.5.30.) oraz międzynarodowych (B.5.39.; B.5.40.; B.5.41.; B.5.43.; B.5.44.).

5. Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego

Mój całkowity dorobek naukowy wg punktacji MNiSW wynosi 461 punktów. Sumaryczny Impact Factor dla opublikowanych przeze mnie prac wynosi 8,408. Dotychczas jestem autorem lub współautorem 109 prac, z czego 87 opublikowałam po uzyskaniu stopnia doktora. Na mój dorobek składa się 40 (34 po doktoracie) oryginalnych prac twórczych (w tym 6 z IF) oraz 8 (6 po doktoracie) rozdziałów w monografiach i prac przeglądowych. Pozostałe prace stanowią: komunikaty na konferencjach 56 (w tym 14 na konferencjach o zasięgu międzynarodowym i 9 referatów), opisy patentowe 2, rozdziały w podręcznikach 2.

Poznań, dnia 14.03.2013 r.