

Prof. dr hab. Zdzisław Targoński

Lublin, 6.09.16

Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka

Towaroznawstwa Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

20-704 Lublin, ul Skromna 8

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Żylińskiej pt. „Charakterystyka funkcjonalna i wykorzystanie technologiczne dzikich szczepów bakterii fermentacji mlekowej”, asystentki w Zakładzie Biotechnologii Mleka, Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie

Bakterie fermentacji mlekowej wchodzą w skład mikrobiomu wielu ekosystemów. Dotychczasowe dane na temat mikrobiomu pochodziły głównie z badań opartych o izolację i fenotypową identyfikację drobnoustrojów. Wprowadzenie metod genotypowych, w tym analizy sekwencji regionu 16S rRNA wykazało, że od 20 do 60% drobnoustrojów składających się na mikrobiom człowieka i zwierząt nie hoduje się *in vitro*. Badania nad mikrobiomem różnych nisz ekologicznych, niewątpliwie przyczyniają się do lepszego zrozumienia znaczenia drobnoustrojów autochtonicznych w poszczególnych środowiskach. Jednocześnie po wyizolowaniu i scharakteryzowaniu, poszczególne szczepy lub ich konsorcja mogą być wykorzystywane w procesach fermentacyjnych. Najlepszym tego przykładem są bakterie fermentacji mlekowej, które znajdują liczne zastosowania w produkcji fermentowanej żywności i pasz. Rozwój biologii molekularnej, a także postęp w tradycyjnych technikach mikrobiologicznych, stwarza możliwości pozyskiwania nowych, interesujących z punktu widzenia technologicznego, prozdrowotnego czy sensorycznego szczepów bakterii fermentacji mlekowej, pochodzących z lokalnych

ekosystemów. Tego typu szczepy mogą mieć korzystniejsze cechy probiotyczne dla lokalnej społeczności, niż szczepy pochodzące z odległych regionów. Z kolei dobrze skonstruowane konsorcja bakterii startowych mogą być korzystniejsze z technologicznego punktu widzenia dla końcowego produktu niż stosowane dotychczas szczepy drobnoustrojów. Dlatego prace nad poszukiwaniem nowych szczepów, ich charakterystyką oraz aplikacją, w tym bakterii fermentacji mlekowej, znajdują pełne uzasadnienie.

W ocenianej rozprawie Doktorantka przyjęła dwie hipotezy badawcze, które zakładają, że mleko pochodzące z różnych regionów Polski zawiera bakterie fermentacji mlekowej o szerokim spektrum właściwości funkcjonalnych, a w związku z tym mogą one znaleźć zastosowanie jako kultura starterowa w produkcji serów twarogowych. Badania realizowano w dziesięciu logicznie następujących po sobie etapach, począwszy od poboru próbek mleka, izolacji i charakterystyce szczepów, otrzymywania sera twarogowego w skali laboratoryjnej i półtechnicznej, kończąc na badaniu potencjału metabolicznego wybranych szczepów.

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Małgorzaty Ziarno, prof. SGGW w Warszawie, a promotorem pomocniczym była dr Magdalena Kowalczyk z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Doktorantka miała znakomitych konsultantów, specjalizujących się w badaniach nad bakteriami fermentacji mlekowej tj. prof. dr hab. Jacka Bardowskiego i dr hab. Piotra Kołakowskiego, co miało niewątpliwie wpływ na wysoki poziom naukowy prowadzonych prac badawczych. Ponadto, należy zwrócić uwagę, że opublikowanie rozprawy doktorskiej poprzedziły liczne prace naukowe, których współautorem była mgr inż. Żylińska, w tym 8 prac w czasopismach z Impact factor, o łącznej sumie IF=18,607 i łącznej liczbie punktów MNiSW = 233 oraz 4 publikacje w czasopismach znajdujących się na liście B MNiSzW.

Oceniana rozprawa jest opracowaniem obszernym, zamieszczonym na 210 stronach z klasycznym układem poszczególnych rozdziałów. Pierwsza część, to krótkie wprowadzenie w temat rozprawy, a dalej przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego tematu rozprawy, sformułowanie celu i zakresu pracy, opis materiałów i metod badawczych, omówienie wyników i ich dyskusja oraz podsumowanie i wnioski. Na materiał faktograficzny dobrze dokumentujący przebieg poszczególnych

eksperymentów, składają się 22 tabele i 48 rysunków. W pracy cytowane są 282 pozycje piśmiennictwa, w tym ponad 90% to prace anglojęzyczne, ważne dla podjętej tematyki badawczej.

Przegląd piśmiennictwa składa się z 5 podrozdziałów. W pierwszym z nich Autorka charakteryzuje bakterie fermentacji mlekowej (LAB), koncentrując się na metabolizmie sacharydów i cytrynianów oraz enzymach proteolitycznych i lipazach. W dalszej części omawia aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów oporności na bakteriofagi oraz charakteryzuje właściwości probiotyczne bakterii fermentacji mlekowej. W kolejnym podrozdziale omawia klasyfikację i metody identyfikacji LAB, a następnie przedstawia znaczenie i zastosowanie LAB w biotechnologii i przemyśle spożywczym. Końcowe dwa rozdziały dotyczące mikroflory surowego mleka krowiego, koziego i owczego oraz opisu technologii serów twarogowych dobrze przygotowują czytelnika do części eksperymentalnej pracy.

Przegląd piśmiennictwa oparty został o aktualne i ważne publikacje dotyczące tematyki zawartej w eksperymentalnej części pracy. Zakres przeglądu jak i dobór treści w poszczególnych podrozdziałach jest trafny, merytorycznie uzasadniony. Przegląd zagadnień związanych z tematyką badań jest opracowany bardzo starannie i wskazuje na bieżące analizowanie przez Doktorantkę piśmiennictwa naukowego z zakresu rozprawy doktorskiej.

W rozdziale „Materiał i metodyka pracy” Doktorantka w pierwszej kolejności opisała materiał badawczy wykorzystywany w doświadczeniach oraz wymieniła aparaturę zastosowaną w poszczególnych eksperymentach. Następnie Autorka przedstawiła metodykę pracy, opisując na ogół dość precyzyjnie poszczególne eksperymenty. W dwóch przypadkach tj pkt. 3.2.6.4 oraz 3.2.8.2 opisy są lakoniczne. W pierwszym przypadku dotyczącym badań oporności na bakteriofagi przemysłowe podano, iż oznaczenie wykonano w pracowni bakteriofagów, obecnie nie istniejącego Zakładu Danisco Biolacta Olsztyn. Brak odnośnika literaturowego dotyczącego źródła metodyki badań, uniemożliwia odniesienie się do niej. W drugim przypadku dotyczącym analizy fizykochemicznej sera kwasowego, oznaczenia wykonano w akredytowanym laboratorium Silliker Polska w Warszawie, także nie informując o zastosowanych metodach np. oznaczania witamin, kwasów tłuszczowych, czy makro i mikroelementów. Tym niemniej należy stwierdzić, że dobór opisanych metod

analizy był prawidłowy i w dużej mierze zgodny z tymi, z których korzystali także inni badacze prowadzący podobne badania, co Doktorantka. Część uzyskanych wyników poddano analizie statystycznej, celem oceny istotności zróżnicowania wyznaczonych wielkości.

Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej łączy wyniki badań z ich omówieniem oraz dyskusją, co na ogół negatywnie odbija się na swobodzie i zakresie dyskusji. Omówienie wyników badań Doktorantka rozpoczyna od opisu pozyskania próbek surowego mleka, a następnie izolacji szczepów pod kątem czterech rodzajów bakterii fermentacji mlekowej. W sumie pozyskano 207 szczepów należących do rodzajów; *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* lub *Pediococcus*. Przynależność rodzajową badanych szczepów określono na podstawie analizy fragmentów zamplifikowanych na matrycy genomowej DNA. Wśród zgromadzonej kolekcji szczepów dominował rodzaj *Lactococcus*, ze 124 szczepami oraz *Lactobacillus*, do tego rodzaju zaliczono 78 szczepów. Jest rzeczą interesującą i zastanawiającą, że z mleka krowiego wyizolowano 12 gatunków LAB, z mleka koziego 6 gatunków, a z mleka owczego tylko 3 gatunki, należące do w/w rodzajów LAB. Ważny wniosek z tego etapu badań, pochodzi z analizy bioróżnorodności szczepów LAB, wyizolowanych z różnych regionów Polski. Stwierdzono zróżnicowanie w profilach genomowych DNA szczepów należących do tego samego gatunku, w tym w liczbie i rodzaju plazmidów pomiędzy poszczególnymi regionami. Ta bioróżnorodność znalazła swoje odzwierciedlenie w wynikach badań właściwości metabolicznych szczepów LAB, należących do czterech badanych rodzajów. Zdolności do wykorzystywania różnych źródeł węgla przez badane szczepy badano wykorzystując test API 50CHL. Najwięcej źródeł węgla wykorzystywał rodzaj *Lactobacillus*, w szczególności gatunki *L. plantarum* i *L. casei*, a następnie rodzaj *Lactococcus*, w szczególności gatunek *L. lactis* subsp. *lactis*. Znacznie uboższy potencjał w metabolizowaniu sacharydów miał rodzaj *Leuconostoc* i *Pediococcus*. Te informacje mają istotne znaczenie w praktycznym wykorzystaniu poszczególnych szczepów i gatunków w procesach technologicznych. W tym miejscu należy zwrócić uwagę choćby na fakt, że 7% szczepów gatunku *L. lactis* subsp. *lactis* nie wykazywało zdolności do fermentacji laktozy, podstawowego sacharydu mleka. Zbliżoną wartość do w/w otrzymano dla rodzaju *Lactobacillus*.

Enzymy hydrolityczne wytwarzane przez bakterie fermentacji mlekowej mają istotny wpływ na przebieg wielu procesów zachodzących w produktach mleczarskich, w szczególności serach dojrzewających, a jednocześnie mogą stanowić istotny element w charakterystyce poszczególnych szczepów bakterii. W stosunku do badanych szczepów określono aktywności 19 enzymów hydrolitycznych z wykorzystaniem testu API ZYM firmy BioMerieux (Francja). Pełnym kompleksem enzymów charakteryzował się gatunek *Lactobacillus plantarum*, zaś nieco mniejszym *Lactococcus lactis*.subsp. *lactis*. Z kolei najniższym spektrum enzymatycznym charakteryzowały się gatunki *Lactococcus raffinolactis* i *Lactobacillus curvatus*. Należy jednak zwrócić uwagę na pewne ograniczenia w/w testu i tak np. zdecydowana większość szczepów nie dała pozytywnego wyniku w teście na trypsynę i α -chymotrypsynę, co może sugerować brak aktywności proteolitycznej u badanych szczepów, co wydaje się mało prawdopodobne. Podobną uwagę można mieć do omawianego w pracy gatunku *L. raffinolactis*, którego szczep badany w ocenianej pracy nie dał pozytywnego wyniku podczas badań na obecność enzymu α -galaktozydazy, a z kolei temu gatunkowi przypisuje się uzdolnienia do degradacji rafinozy. Tego typu zastrzeżeń jest o wiele więcej.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka dokonała oceny zawartości plazmidów w komórkach badanych szczepów. Stwierdziła, że wszystkie badane szczepy posiadały plazmidy, a obrazy elektroforetyczne plazmidów przedstawiła dla ponad 20 szczepów. Następnie Doktorantka oceniała zdolności antagonistyczne badanych szczepów. Tylko 23 z nich wykazało zdolność hamowania wzrostu szczepu referencyjnego, wrażliwego na działanie bakteriocyn.

W następnym podrozdziale rozprawy doktorskiej mgr inż. Żylińska przedstawiła i omówiła wyniki badań dotyczące cech technologicznych wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Oceniała 11 szczepów biorąc pod uwagę; szybkość ukwaszania mleka, strukturę powstałego skrzepu i wygląd wydzielonej serwatki, oporność na bakteriofagi przemysłowe, profil aromatyczny, zdolność do wytwarzania gazu i unoszenia skrzepu, test na koegzystencję oraz ocenę organoleptyczną skrzepu. Na podstawie tych parametrów skonstruowano 6 zestawów kultur starterowych do produkcji sera twarogowego, z których najlepszymi cechami charakteryzował się zestaw oznaczony jako JZ-IBB-3. Zestaw ten, nie odbiegał właściwościami w

tworzeniu skrzepu od zestawu komercyjnego, co należy uznać za poważne osiągnięcie rozprawy doktorskiej. Wyniki badań w skali laboratoryjnej zostały potwierdzone w skali półtechnicznej z zakładzie mleczarskim. Analiza cech technologicznych badanych szczepów wykazała, iż pomimo, że część z nich należała do tego samego gatunku, to otrzymane z ich udziałem skrzepy różniły się między sobą właściwościami. Bioróżnorodność tych szczepów, a także szczepów należących do rodzaju *Lactobacillus* została przebadana metodą RAPD, która bada polimorfizm amplifikowanych fragmentów DNA, wykorzystując do tego celu różne startery. Bogata bioróżnorodność bakterii fermentacji mlekowej została potwierdzona dla wybranych szczepów poprzez badanie potencjału metabolicznego z użyciem fenotypowania metodą mikromacierzy w teście Biolog, z użyciem 192 źródeł węgla, fosforu i siarki. Te badania pokazują, że każdy szczep wchodzący do konsorcjum bakteryjnego wykorzystywanego w procesie technologicznym wnosi określone cechy, pozytywne lub negatywne do właściwości produktu końcowego. Dlatego jest w pełni uzasadnione prowadzenie poszukiwań nowych szczepów drobnoustrojów, zwłaszcza o pozytywnych, niekiedy oryginalnych właściwościach, prowadzących określone procesy technologiczne.

W końcowej części pracy Autorka dokonała podsumowania w postaci spostrzeżeń i wniosków. Wskazują one, iż w wyniku realizacji badań został zrealizowany cel pracy i szczegółowe zadania badawcze. Podkreślają one dużą bioróżnorodność wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej i szerokie możliwości konstrukcji kultury startowej do produkcji sera twarogowego.

Obowiązkiem recenzenta jest zwrócenie uwagi na pewne uchybienia w ocenianej rozprawie, jednak w tym przypadku ograniczają się one do kilku mało istotnych uwag.

I tak;

str. 13- trudno się zgodzić, ze stwierdzeniem; że doskonałym źródłem energii dla bakterii kwasu mlekowego może być celuloza

str. 46 – zwrot „technologia produkcji sera twarogowego” , przypomina zwrot „masło maślane”, winno być „technologia sera twarogowego”

str. 91 – „oznaczenie właściwości metabolicznych szczepów Lactococcus.....” winno być „oznaczenie właściwości metabolicznych szczepów z rodzaju Lactococcus.....”

str. 132 i kolejne – podpis pod rys „Rozdział elektroforetyczny” winno być „obraz rozdziału elektroforetycznego....” lub „elektroforogram.....”

Podsumowanie

W opinii recenzenta, przedstawiona do zaopiniowana praca jest interesującym i wartościowym studium z zakresu pozyskania nowych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, ich charakterystyki funkcjonalnej, ze szczególnym zwróceniem uwagi na ich bioróżnorodność oraz wykorzystania wybranych szczepów w technologii żywności, zwłaszcza w technologii serów twarogowych. W pracy zamieszczono bogaty i dobrze opisany materiał faktograficzny. Doktorantka wykazała się umiejętnością dobrego zaplanowania, a następnie prawidłowej realizacji poszczególnych etapów badań w skali laboratoryjnej, a w końcowym etapie w skali półtechnicznej. Z przedstawionych wyników badań prezentowanych w pracy doktorskiej wynika, że skonstruowany zestaw bakterii jest konkurencyjny w stosunku do zestawu komercyjnego obecnego na rynku, a wykorzystywanego w technologii sera twarogowego.

Biorąc pod uwagę wartość naukową pracy, a także jej cenne wartości aplikacyjne, szeroki zakres przeprowadzonych eksperymentów badawczych, dobre przygotowanie warsztatowe Doktorantki, stwierdzam że przedstawiona do oceny rozprawa pt. „Charakterystyka funkcjonalna i wykorzystanie technologiczne dzikich szczepów bakterii fermentacji mlekowej” mgr inż. Joanny Żylińskiej spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. Nr 65, poz. 595. z póź. zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony.

