

Warszawa, 28.05.2020r.

Prof. dr hab. Małgorzata Gniewosz
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Instytut Nauk o Żywności SGGW w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Góral-Kowalczyk

pt. „Wpływ aplikacji pulsacyjnego pola elektrycznego na bioakumulację wybranych jonów metali w komórkach *Lactobacillus rhamnosus* B442”

Promotor: dr hab. Urszula Pankiewicz, prof.

Promotor pomocniczy: dr hab. Monika Sujka, prof.

Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej

Bakterie kwasu mlekowego spełniają w żywności fermentowanej ważne funkcje. Na skutek swojej działalności kształtują cechy sensoryczne, przedłużają trwałość i poprawiają mikrobiologiczne bezpieczeństwo produktów żywnościowych, zwiększając wartość odżywczą. Bakterie kwasu mlekowego (LAB) od wielu lat inspirują badaczy do odkrywania coraz nowych cech funkcjonalnych tych mikroorganizmów i wykorzystania tego potencjału w gospodarce człowieka. Zdolność LAB do sorpcji metali i ich bioakumulacji w komórkach można wykorzystać do nowych zastosowań w produkcji żywności. Łatwo przyswajalne kompleksy białkowe z jonami pierwiastków pochodzenia mikrobiologicznego mogą w pewnym stopniu uzupełniać niedobory mikro- i makroelementów w diecie człowieka. Zastosowanie nowej techniki, jaką jest pulsacyjne pole elektryczne, do intensyfikacji wiązania jonów metali przez komórki bakterii kwasu mlekowego może zwiększyć ich zastosowanie w produkcji żywności. Z tego względu problematyka badawcza podjęta przez mgr inż. Małgorzatę Góral-Kowalczyk w rozprawie doktorskiej jest nie tylko wysoce aktualna, ale i nowatorska. Wiąże się ona z jednej strony z uzyskaniem wzbogaconych komórek LAB w jony metali przy użyciu pulsacyjnego pola elektrycznego, a z drugiej z propozycją zastosowania tak przygotowanych LAB potencjalnie probiotycznych do produkcji żywności funkcjonalnej. Należy podkreślić, że

zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej są bardzo aktualne. Dlatego uważam, że dokonany przez mgr inż. Małgorzatę Góral-Kowalczyk wybór wyżej wymienionych badań jest w pełni uzasadniony.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Małgorzaty Góral-Kowalczyk jest cyklem publikacji naukowych pod wspólnym tytułem „Wpływ aplikacji pulsacyjnego pola elektrycznego na bioakumulację wybranych jonów metali w komórkach *Lactobacillus rhamnosus* B442”, w skład którego wchodzi 7 oryginalnych prac twórczych opublikowanych w czasopiśmie z listy A MNiSzW (**PI**: *Journal of Membrane Biology* 250(5), 565-572, 2017; **PII**: *Food Chemistry* 239, 1151-1159, 2018; **PIII**: *European Food Research and Technology* 245, 817-824, 2019; **PIV**: *International Journal of Food Science & Technology* 54, 2035-2044, 2019; **PV**: *LWT-Food Science and Technology* 116, 108562, 2019; **PVI**: *Journal of Food Engineering* 275, 109876, 2020; **PVII**: *Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(1), 44-53, 2020). Prace te zostały opublikowane w latach 2017-2020. Suma punktów za publikacje wchodzące w cykl (w roku wydania) według listy MNiSzW wynosi 510, a sumaryczny współczynnik wpływu (IF) w/w prac wynosi 20,688. Pełne teksty oryginalnych prac twórczych zostały dołączone do opracowania, które jest przewodnikiem i zarazem uzupełnieniem do dołączonych artykułów. Opracowanie liczące 48 stron maszynopisu zawiera kilka rozdziałów. Na początku zamieszczono Streszczenie w języku polskim i angielskim. Następnie przedstawiono krótkie wprowadzenie teoretyczne (3 strony), Hipotezę badawczą i Cel pracy oraz Materiały i Metody Badawcze, które zamieszczono na 5 stronach. Prezentację wybranych wyników badań opracowano na 20 stronach wraz z 16 rysunkami i 3 tabelami. Podsumowanie i Wnioski przedstawiono na 2 stronach. Spis literatury obejmuje 37 pozycji w języku polskim i angielskim. Przedstawiony układ opracowania jest logiczny i bardzo przejrzysty.

W cyklu artykułów naukowych mgr inż. Małgorzata Góral-Kowalczyk jest pierwszą lub drugą autorką. Publikacje są kilkautorские od 2 do 7 osób. Udział mgr inż. Małgorzaty Góral-Kowalczyk w pracach wchodzących w cykl był od 45% (w czterech publikacjach), 50% (w dwóch publikacjach) do 60% (w jednej publikacji), co świadczy o dużym zaangażowaniu Doktorantki w ich realizację.

W jednym z ostatnich rozdziałów został przedstawiony dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki, na który składają się oprócz cyklu publikacji z rozprawy doktorskiej, 3 oryginalne prace twórcze, 10 publikacji przeglądowych i 13 doniesień konferencyjnych. Tak bogaty dorobek młodego naukowca, jakim jest mgr inż. Małgorzata Góral-Kowalczyk, niewątpliwie

świadczy o dużych sukcesach Jej pracy badawczej, ale też możliwościach realizacji tej pasji w bardzo dobrym zespole naukowym, prowadzonym przez promotora pracy dr hab. Urszulę Pankiewicz, prof.

Ocena merytoryczna pracy

W zwięzłym wprowadzeniu Doktorantka zwróciła uwagę na istotny problem niedoboru mikro- i makroelementów w diecie człowieka oraz przyczyny tego zjawiska. Przedstawiła rolę magnezu, cynku i wapnia, jaką pełnią w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu człowieka. Następnie zwróciła uwagę na wszechstronne wykorzystanie LAB w produkcji żywności, ich korzystne właściwości prozdrowotne i technologiczne. W przypadku bakterii z rodzaju *Lactobacillus* istnieje wiele udokumentowanych dowodów m.in. na korzystny wpływ na mikroflorę jelitową, prawidłowe funkcjonowanie przewodu pokarmowego i układu odpornościowego organizmu. Te korzyści z występowania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w żywności fermentowanej i ich naturalna zdolność do wiązania metali skłaniają do opracowania metody wzbogacania komórek tych bakterii w jony metali, których jest niedobór w diecie człowieka. Jest kilka możliwości osiągnięcia tego celu. Dotychczas opisywano naturalną metodę pobierania jonów metali przez komórki z pożywki. Doktorantka wybrała nowatorską metodę z wykorzystaniem pulsacyjnego pola elektrycznego, co miało zintensyfikować suplementację komórek bakterii. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury Doktorantka dostarczyła przekonujących argumentów za powodzeniem tej metody i w mojej opinii był to słuszny wybór. Uważam, że zawarte w części teoretycznej treści pracy świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Autorki do podjęcia badań.

W kolejnym rozdziale opracowania mgr inż. Małgorzata Góral-Kowalczyk sformułowała **trzy hipotezy badawcze**, iż pulsacyjne pole elektryczne (PEF) o zoptymalizowanych parametrach powoduje wysoką bioakumulację wybranych jonów w komórkach szczepów bakterii kwasu mlekowego; bioakumulacja jonów w komórkach, przyrost biomasy i żywotność decyduje o wyborze szczepu LAB do produkcji żywności funkcjonalnej oraz zastosowanie odpowiednich szczepów LAB wzbogaconych jonami metali ma wpływ na ogólną liczbę mikroorganizmów i kształtowanie cech fizykochemicznych produktu. W celu weryfikacji postawionych hipotez, mgr inż. Małgorzata Góral-Kowalczyk przyjęła **za cel** badań wpływ PEF na akumulację jonów magnezu, cynku, selenu i wapnia w komórkach *Lactobacillus rhamnosus* B442 oraz zastosowanie tak wzbogaconego w jony metali szczepu do produkcji żywności funkcjonalnej. Cel pracy został jasno sformułowany. **Zakres pracy** można generalnie podzielić na dwa etapy. Pierwszy etap obejmował wybór szczepu LAB i optymalizację

parametrów PEF pod względem najwyższej akumulacji jonów i wysokiej gęstości optycznej hodowli szczepów. Z kolei w drugim etapie skoncentrowano się na otrzymaniu potencjalnie probiotycznych lodów z udziałem szczepu wzbogaconego w jony metali za pomocą PEF, wraz z charakterystyką cech jakościowych tych produktów.

W kolejnym rozdziale mgr inż. Małgorzata Góral-Kowalczyk przedstawiła materiały i wymieniła metody badań mikrobiologicznych i fizykochemicznych, które są dokładnie opisane w publikacjach. W skróconej wersji zamieszczono także schemat hodowli biomasy bakterii w połączeniu z wariantami elektroporacji (rys.1) oraz produkcji lodów zawierających wzbogacone bakterie w jony metali za pomocą PEF (rys.2). Materiałem biologicznym pracy było 7 szczepów LAB, w tym pięć z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* i dwa z gatunku *Lactobacillus lactis*, które pochodziły z Kolekcji Czystych Kultur Katedry Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności UP w Lublinie. W mojej opinii badania były wykonane przy użyciu dobrze dobranych i nowoczesnych metod, które gwarantowały uzyskanie wiarygodnych wyników.

W rozdziale „Prezentacja wybranych wyników badań” Doktorantka przedstawiła wyniki badań w oparciu o siedem oryginalnych publikacji naukowych. Badania zostały rozpoczęte od skringingu szczepów LAB pod względem maksymalnej zawartości biomasy, wyrażonej jako gęstość optyczna (OD), w obecności określonych stężeń jonów magnezu, selenu i cynku w pożywce. Spośród 7 szczepów hodowla *Lactobacillus rhamnosus* B 442 charakteryzowała się największą gęstością optyczną w całym zakresie badanych stężeń jonów metali oraz najwyższą koncentracją magnezu i na tej podstawie szczep ten był stosowany w dalszych badaniach. W odniesieniu do wyników tych doświadczeń nasuwa się pytanie: *Jaka może być przyczyna tak dużej różnicy we wzroście szczepów należących do tego samego gatunku w obecności jonów metali oraz akumulacji jonów metali w komórkach ?*

W kolejnej części przedstawiono wyniki badań wpływu stężenia jonów metali w pożywce i optymalizacji parametrów PEF na zawartość tych jonów w komórkach *L. rhamnosus* B442 i zmiany zawartości biomasy. Kryterium wyboru stężenia jonów w pożywce i parametrów PEF była maksymalna akumulacja jonów w biomacie bakteryjnej. W efekcie tych badań wykazano, że komórki pochodzące z 20 h hodowli *L. rhamnosus* B442 (w przeciwieństwie do 8 i 12 h) były bardziej predysponowane do nagromadzania jonów metali. Najwyższą akumulację jonów magnezu w biomacie bakterii (4,28 mg Mg²⁺/g s.m) stwierdzono w pożywce zawierającej 400 µg Mg²⁺/ml i poddanej działaniu PEF przy natężeniu pola wynoszącym 2,0 kV/cm podczas 15 min ekspozycji pola i przy szerokości impulsu 20 µs. Z kolei najwyższą akumulację jonów cynku w biomacie (2,85/g s.m.) uzyskano w pożywce z 500 µg Zn²⁺ /ml przy zastosowaniu

wyższego natężenia pola (3,0 kV/cm), ale podczas takiego samego czasu ekspozycji pola (15 min) i szerokości impulsu (20 μ s). Dla maksymalnej akumulacji jonów wapnia (4,48 mg/g s.m.) ustalono następujące parametry PEF: natężenie pola 3,0 kV/cm, czas ekspozycji 10 min, szerokość impulsu 75 μ s i stężenie jonów wapnia 200 μ g /ml pożywki. Oszacowano, że koncentracja jonów magnezu była o 220%, jonów cynku o 164%, a jonów wapnia aż o 513% większa niż w biomacie bakterii nie poddanej działaniu PEF. Bioakumulacja jonów cynku i wapnia nastąpiła wewnątrz komórek bakterii, co potwierdziły badania mikroskopowe. Nasuwa się pytanie: *Jaki wpływ na ścianę komórkową bakterii *L. rhamnosus* ma pulsacyjne pole elektryczne?*

W następnym etapie badań skoncentrowano się na ocenie zmian przeżywalności bakterii w zależności od stężenia jonów metali w pożywce w zakresie od 10 do 1000 μ g/ml. Przeżywalność szczepu po potraktowaniu hodowli PEF wyrażano jako ogólną liczbę mikroorganizmów (jtk/ml) i wydajność biomasy (g s.s./100 ml). W efekcie tych badań wykazano dobrą przeżywalność szczepu *L. rhamnosus* B442 poddanego działaniu PEF, niezależnie od natężenia pola, czasu ekspozycji i czasu hodowli szczepu, a jednocześnie dobrą akumulację jonów metali w biomacie.

W drugiej części pracy skupiono się na praktycznym zastosowaniu tak zmodyfikowanej biomasy bakterii LAB w tradycyjnej produkcji żywności. Ustalono, że dodatek potencjalnie probiotycznych szczepów wzbogaconych magnezem nie zmienił parametrów chemicznych lodów i nie wpłynął na proces zamrażania, topliwość i twardość. Całkowita liczba mikroorganizmów w lodach była wyższa niż w kulturach starterowych. Podobnie, dodatek kultury *L. rhamnosus* B442 wzbogaconych w cynk oraz wapń nie spowodował zmian we właściwościach lodów. Mimo spadku liczby mikroorganizmów w trakcie przechowywania lodów przez 90 dni nadal produkt można było uznać za probiotyczny. Stwierdzono, że PEF spowodowało zwiększenie bioakumulacji łatwo przyswajalnych jonów wapnia. Nasuwa się pytanie: Czym kierowała się Doktorantka, wybierając produkcję lodów, a nie bardziej powszechnego produktu w żywieniu człowieka, do aplikacji bakterii wzbogaconych w jony deficytowych pierwiastków ?

W ostatnim rozdziale opracowania „Podsumowanie i wnioski” mgr inż. Małgorzata Góral-Kowalczyk sformułowała dziesięć wniosków. W mojej opinii wnioski zawierają najważniejsze konkluzje wynikające z pracy. Proszę o wyjaśnienie wniosku 1, dotyczącego oporności szczepów LAB na działanie jonów metali.

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Góral-Kowalczyk pod względem merytorycznym uważam, że wyniki Jej stanowią duży wkład w poznawaniu i zrozumieniu

zjawiska bioakumulacji jonów metali przez szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus*. Zaproponowana technologia produkcji lodów poszerzyła wiedzę na temat wykorzystania potencjału bakterii kwasu mlekowego jako nośników deficytowych pierwiastków w diecie człowieka. Przyjęcie prac do druku w renomowanych czasopismach naukowych uznaję za świadectwo bardzo dobrego poziomu merytorycznego prowadzonych badań, ich poprawności metodycznej i wysokiego poziomu dyskusji merytorycznej. Publikacje wchodzące w cykl badań do rozprawy doktorskiej wnoszą istotny wkład poznawczy i aplikacyjny do nauki w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Małgorzaty Góral-Kowalczyk pt. „Wpływ aplikacji pulsacyjnego pola elektrycznego na bioakumulację wybranych jonów metali w komórkach *Lactobacillus rhamnosus* B442” jest spójnym tematycznie zbiorem siedmiu oryginalnych publikacji naukowych. Niewątpliwie stanowi on rozwiązanie problemu naukowego, przedstawionego na początku rozprawy. Doktorantka dowiodła, że dysponuje szeroką wiedzą, wraz z promotorem potrafi planować badania naukowe, samodzielnie wykonać, analizować i interpretować wyniki badań, a także je publikować. Rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane pracom na stopień doktora zawarte w Ustawie z dnia 14.03.2003r. z następującymi potem zmianami, o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Małgorzaty Góral - Kowalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Kowalczyk