

prof. dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

Łódź, 2.06.2020

### Ocena

pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Marty Góral-Kowalczyk

nt. „Wpływ aplikacji pulsacyjnego pola elektrycznego na bioakumulację wybranych jonów metali w komórkach *Lactobacillus rhamnosus* B 442”

wykonanej

na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności

*Promotor:* dr hab. Urszula Pankiewicz, prof. uczelni

*Promotor pomocniczy:* dr hab. Monika Sujka, prof. uczelni

#### **Podstawa formalna**

*Recenzję, której przedmiotem jest rozprawa doktorska nt. „Wpływ aplikacji pulsacyjnego pola elektrycznego na bioakumulację wybranych jonów metali w komórkach *Lactobacillus rhamnosus* B 442” wykonałam na zlecenie Przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia prof. dr hab. Waldemara Gustawa na podstawie powołania mnie na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Małgorzaty Marty Góral-Kowalskiej uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 17.05.2017 roku.*

#### **Wybór i znaczenie tematu**

Dynamiczny rozwój nowoczesnych technologii produkcji żywności skutkuje wprowadzaniem nowych asortymentów produktów spożywczych. Wzrost zamożności społeczeństwa przekłada się na zmiany preferencji żywieniowych, a konsumenci chętniej sięgają po żywność wygodną, wysoko przetworzoną, o długich terminach przydatności do spożycia. Pomimo promowania w ostatnich latach modelu zdrowego żywienia, nadal w koszyku zakupowym przeciętnego konsumenta przeważają produkty atrakcyjne smakowo,

ale często ubogie w makro- i mikroelementy niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Równocześnie powszechna staje się suplementacja diety preparatami mineralno-witaminowymi, a rynek farmaceutyczny oferuje szeroką gamę suplementów diety w formie zestawów mikro-, makroelementów i witamin w różnych kompozycjach. Suplementacja tymi preparatami nie rozwiązuje jednak problemu niedoboru mikroelementów ze względu na niską ich przyswajalność. Alternatywnym rozwiązaniem stają się metaloproteiny drożdżowe lub bakteryjne. Zastosowanie pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF – pulsed electric field) jako czynnika zwiększającego efektywność tworzenia metaloprotein przez drobnoustroje jest techniką stosowaną od dawna, ale jej szerokie wykorzystanie w technologii ograniczają nie tylko koszty aparatury, ale przede wszystkim trudności związane z optymalizacją procesu pozyskiwania biomasy drobnoustrojów wzbogaconej w metaloproteiny. Bariereą stanowi tu przede wszystkim indywidualna odpowiedź mikroorganizmu na stres środowiskowy, jakim jest zarówno podwyższone stężenie związków metali, jak i pulsacyjne pole elektryczne. Dokonanie przez mgr Małgorzatę Góral-Kowalczyk wyboru tej techniki jako sposobu na efektywną fortyfikację bakterii w mikro- i makroelementy uważam za właściwy, a pokonanie bariery optymalizacji może stanowić początek ścieżki aplikacyjnej dla pozyskiwania metaloprotein bakteryjnych.

Wprowadzanie do żywności bakterii probiotycznych stało się już powszechną praktyką. W szerokim wachlarzu szczepów bakterii mlekowych o udokumentowanych właściwościach probiotycznych pałeczki *Lactobacillus rhamnosus* uznawane są za jeden z cenniejszych gatunków. Stanowią one element naturalnej mikrobioty jelitowej człowieka, a ich dobroczynne działanie jest bogato udokumentowane w badaniach *in vitro* w warunkach symulacji przewodu pokarmowego oraz w badaniach klinicznych. Jak w przypadku każdego gatunku drobnoustrojów, ekspresja fenotypowa ich cech w obrębie gatunku jest zróżnicowana międzyszczepowo. Najlepiej zbadany klinicznie jest szczep *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103, wyizolowany w 1983 roku, sekwencja genomu opisana w 2009 roku), któremu przypisuje się m. in.: skuteczność w leczeniu ostrej biegunki infekcyjnej i związanej z antybiotykoterapią, profilaktyce w biegunce podróżnych, zapobieganie i łagodzenie atopowego zapalenia skóry, wspomaganie odporności, czy łagodzenie dolegliwości zaburzeń funkcjonowania przewodu pokarmowego u wcześniaków (Parian A.M. i wsp. 2018, W: *Integrative Medicine* Rakel D. (Ed.), Elsevier Inc.; Kotowska M., Albrecht P. 2014, *Forum Zakażeń* 5(2):111-119). Wybór *L. rhamnosus* jako obiektu do badań nad wzmocnieniem zdolności bakterii do bioakumulacji jonów metali jest trafny i w pełni uzasadniony w świetle ich potencjalnego zastosowania w żywności funkcjonalnej. Probiotyczny szczep *L. rhamnosus* bogaty w metaloproteiny mógłby stanowić cenny składnik wielu produktów spożywczych wytwarzanych z wykorzystaniem mleka fermentowanego.

## **Ocena formalna pracy**

Praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Góral-Kowalczyk obejmuje 119 stron. Opracowanie zawiera 77 nienumerowanych stron obejmujących siedem publikacji w języku angielskim, poprzedzonych 44 numerowanymi stronami omówienia wyników badań w języku polskim wraz z literaturą oraz zestawieniem osiągnięć naukowych Doktorantki na czterech kolejnych stronach. W rozprawie wydzielono 10 głównych rozdziałów, z czego trzon stanowią: Wprowadzenie, Hipoteza badawcza i cel pracy, Materiał i metody badawcze, Prezentacja wybranych wyników badań, Podsumowanie i wnioski, Literatura, Wykaz publikacji oraz Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. Pozostałe części to streszczenia w języku polskim i języku angielskim. Dokumentacja w formie 16 rysunków oraz 3 tabel została zamieszczona w części „Prezentacja wybranych wyników badań”. Szkoda, że w części dysertacji stanowiącej przewodnik do publikacji nie zawarto dyskusji wyników z danymi literaturowymi, co znacznie ułatwiłoby odbiór pracy i umożliwiłoby pozycjonowanie całości rozległych badań na tle literatury przedmiotu. Pod względem edytorskim tekst rozprawy należy rozpatrywać jako dwa osobne elementy, przy czym recenzent nie czuje się upoważniony do oceny językowej prac publikowanych w czasopismach naukowych. Część dysertacji napisana w języku polskim i omawiająca publikacje jest dobrze przygotowana, a nieliczne błędy literowe nie zakłócają odbioru pracy i nie wpływają na jej wartość naukową.

Przedstawiona do oceny praca doktorska oparta jest na homogennym zbiorze siedmiu monotematycznych publikacji (PI-PVII) w czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku wpływu *Impact factor* równym 20,688 (zgodnie z rokiem opublikowania). Publikacje pochodzą z ostatnich czterech lat: po jednej z 2017 (PI) i 2018 roku (PII), trzy z 2019 roku (PIII, PIV i PV) oraz dwie z 2020 roku (PV i PVI). Wszystkie publikacje są wieloautorskie, od 2 do 6 autorów, przy czym Doktorantka jest pierwszym autorem w czterech (PI, PII, PIII i PVII) i autorem korespondencyjnym w trzech publikacjach (PI, PII i PIV). Mgr Małgorzata Góral-Kowalczyk deklaruje 60% udział w jednej publikacji (PI), 50% udział w dwóch (PII i PIII) oraz 45% w każdej z czterech pozostałych. Artykuły składające się na rozprawę doktorską ukazały się w renomowanych czasopismach publikujących prace w obszarze mikrobiologii i technologii żywności i żywienia, a ich wysokie pozycjonowanie w tych dyscyplinach świadczy o aktualności i wartości badań prowadzonych przez Panią Małgorzatę Góral-Kowalczyk. Duży udział procentowy Pani Magister w pracach związanych z przeprowadzeniem badań, opracowaniem wyników i przygotowaniem publikacji wskazuje na pełne zaangażowanie i wiodącą rolę Doktorantki.

## **Ocena merytoryczna pracy**

Trzystronicowe, obszernie streszczenie pracy przedstawia zakres prowadzonych badań oraz wskazuje zasadniczy cel pracy, zwiększenie akumulacji wybranych metali w komórkach bakterii *L. rhamnosus* przy zastosowaniu pulsacyjnego pola elektrycznego. Ta część pracy wiernie przekazuje tok i rezultaty badań, ale nie zawiera końcowych wniosków wiążących badania o charakterze podstawowym z dobrze udokumentowanymi badaniami aplikacyjnymi oraz wskazania np. korzyści dla konsumenta, czy producenta lodów zawierających kultury bakterii *L. rhamnosus* B 442 wzbogacone w mikro- i makroelementy.

Zwięzłe wprowadzenie nakreśla tło podjętego tematu, podkreślając rolę magnezu, cynku i wapnia w organizmie człowieka. Mgr Małgorzata Góral-Kowalczyk uzasadnia tu również wybór bakterii fermentacji mlekowej jako modelu badawczego, mikroorganizmów probiotycznych, charakteryzujących się zdolnością do wiązania jonów metali w procesie wymiany jonowej, kompleksowania, chelatowania czy mikroprecypitacji. Autorka opisuje technikę pulsacyjnego pola elektrycznego, wskazując zarówno na jego działanie na organizmy żywe, jak i wykorzystanie aplikacyjne w układach biologicznych. Podkreślam tu świadomość Doktorantki zalet i wad stosowania tej techniki, a szczególnie konieczności starannego doboru parametrów PEF dla konkretnego organizmu.

Hipotezy badawcze zostały jasno sformułowane i w pełni przedstawiają koncepcję i założenia pracy doktorskiej. Cel pracy jest logiczną konsekwencją hipotez badawczych, a poszczególne hipotezy są konsekwentnie weryfikowane. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres pracy oraz połączenie badań podstawowych (optymalizacja PEF, badania akumulacji mikroelementów w komórkach bakterii) z aspektem aplikacyjnym (na przykładzie produktu z dodatkiem probiotyku). Analiza własności i trwałości produktu została przeprowadzona dogłębnie, z uwzględnieniem niemal wszystkich parametrów reologicznych i sensorycznych. Opis materiałów i metod badań jest właściwy i umożliwia odtworzenie eksperymentów w innych laboratoriach badawczych, co jest szczególnie istotne w przypadku badań optymalizacji efektywności stosowania PEF na komórki mikroorganizmów. Integralną częścią dysertacji jest siedem publikacji, współautorstwa Doktorantki. Intensyfikacja akumulacji wybranych jonów metali: magnezu, cynku oraz wapnia pod wpływem pulsacyjnego pola elektrycznego zostały opisane odpowiednio w publikacjach: PI, PIII oraz PVII:

- **PI:** Góral M., Pankiewicz U. (2017). Effect of pulsed electric fields (PEF) on accumulation of magnesium in *Lactobacillus rhamnosus* B 442 cells. *Journal of Membrane Biology*, 250, 565-572

- **PIII:** Góral M., Pankiewicz U., Sujka M., Kowalski R. (2019). Bioaccumulation of zinc ions in *Lactobacillus rhamnosus* B 442 cells under treatment of the culture with pulsed electric field. *European Food Research and Technology*, 245, 817-824
- **PVII:** Góral M., Pankiewicz U., Sujka M., Kowalski R., Góral D., Kozłowicz K. (2019). Influence of pulsed electric field on accumulation of calcium in *Lactobacillus rhamnosus* B 442. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 44-53.

Przyjęcie przez mgr Małgorzatę Góral-Kowalczyk konwencji opisu wyników badań z najważniejszymi elementami dokumentacji, stwarza konieczność równoległego śledzenia odpowiedniej publikacji w celu zapoznania się z dyskusją wyników i wnioskami z kolejnych etapów badań. Niedogodność ta nie wpływa jednak na jasność przekazu, a jedynie zmusza recenzenta do wzmożonej uwagi.

Podstawowym i jedynym kryterium doboru szczepów bakterii mlekowych do badań była ich zdolność do intensywnego wzrostu w obecności jonów magnezu, cynku, selenu i wapnia w różnych stężeniach. Wstępnej ocenie poddano siedem szczepów bakterii: dwa szczepy *Lactococcus lactis* (20729 i JBB 500) oraz pięć szczepów *Lactobacillus rhamnosus* (PEN, OXY, B 1445, 1937 i B 442). Chciałabym podkreślić, że w pełni zgadzam się z Doktorantką co do wyboru bakterii *L. rhamnosus* B 442 jako modelu badawczego. Nie znalazłam jednak jasnych wskazań kryteriów doboru szczepów bakterii mlekowych ze względu na ich własności probiotyczne i późniejsze zastosowanie w produkcie spożywczym, co traktuję jako zagadnienie do dyskusji w czasie obrony pracy. Zwracam również uwagę, że „zmiany gęstości optycznej komórek w zależności od stężenia jonów w pożywce” (Rys. 3-5, s. 20 i 21) nie stanowią „dynamiki wzrostu”, jak wskazano w punkcie 4.1.

Kluczową część badań, zgodnie z tytułem rozprawy doktorskiej, stanowi dobór parametrów pulsacyjnego pola elektrycznego w celu pozyskania biomasy bakterii *L. rhamnosus* B 442 znacząco wzbogaconej w metaloproteiny. Optymalizacja parametrów PEF działającego na żywe komórki jest bardzo pracochłonna i wymaga przeprowadzenia wielu eksperymentów w różnych wariantach. Wprowadzenie jonów metali, kolejnego parametru o silnym wpływie na żywotność komórek, stanowi dodatkową trudność i może znacząco zmieniać odpowiedź komórki. W rezultacie, należy rozważyć pięć zmiennych parametrów: natężenie pola elektrycznego, czas ekspozycji komórek na PEF (czas elektroporacji), szerokość pulsu elektrycznego, wiek hodowli bakterii oraz stężenie jonów metali. Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z doбором parametrów optymalnych dla akumulacji jonów magnezu, cynku i wapnia przez bakterie *L. rhamnosus* B 442. Nie udało się jednak dobrać warunków akumulacji selenu ze względu na toksyczne działanie jego soli. Może zmiana źródła selenu mogłaby rozwiązać ten problem?

Wartościowym elementem pracy jest wizualizacja lokalizacji jonów cynku i wapnia w komórkach bakterii z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. Ta część badań jest nie tylko dowodem na podwyższoną akumulację metali przez *L. rhamnosus* B 442, ale również może być wstępem do dalszych pogłębionych studiów nad sposobem akumulacji i naturą tworzonych związków.

W czterech publikacjach zawarto badania nad wprowadzeniem do lodów bakterii *L. rhamnosus* B 442 wzbogaconych w jony magnezu, cynku i wapnia:

- **PII:** Góral M., Kozłowicz K., Pankiewicz U., Góral, D. (2018). Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. *Food Chemistry*, 239, 1151-1159
- **PIV:** Pankiewicz U., Góral M., Kozłowicz K., Góral D. (2019). Novel method of zinc ions supplementing with fermented and unfermented ice cream with using PEF. *International Journal of Food Science & Technology*, 54, 2035-2044
- **PV:** Kozłowicz K., Góral M., Góral D., Pankiewicz U., Bronowicka-Mielniczuk U. (2019). Effect of ice cream storage on the physicochemical properties and survival of probiotic bacteria supplemented with zinc ions. *LWT – Food Science and Technology*, 116, 108562
- **PVI:** Pankiewicz U., Góral M., Kozłowicz K., Góral D. (2020). Application of pulsed electric field in production of ice cream enriched with probiotic bacteria (*L. rhamnosus* B 442) containing intracellular calcium ions. *Journal of Food Engineering*, 275, 109876.

W prezentowanej do oceny pracy jako przykład żywności funkcjonalnej, którą można suplementować żywymi kulturami bakterii *L. rhamnosus* B 442 wybrano lody. Ta obszerna, doskonale udokumentowana i opracowana część pracy opiera się na hipotezie 3 (s. 15): „Zastosowanie wybranych szczepów bakterii, wzbogaconych jonami metali ma wpływ na ogólną liczbę organizmów i kształtowanie cech fizykochemicznych zapewniających wysoką jakość produktu z zachowaniem jego właściwości potencjalnie probiotycznych”. Wprowadzanie do żywności bakterii probiotycznych o komórkach fortyfikowanych mikro- i makroelementami jest ideą bardzo cenną z żywieniowego punktu widzenia, ale wytworzenie produktu atrakcyjnego, zdrowego i o niezmiennych cechach fizykochemicznych i organoleptycznych jest kolejnym wyzwaniem, którego podjęła się Pani Małgorzata Góral-Kowalczyk. Nie znalazłam w pracy i publikacjach wchodzących w skład rozprawy uzasadnienia żywieniowego popartego wpływem na zdrowie społeczeństwa w szerokim rozumieniu, wyboru do badań lodów jako idealnego produktu. Wśród mlecznych produktów fermentowanych i niefermentowanych, ze względu na niską temperaturę i długi okres

przechowalniczy, lody stanowią stosunkowo trudne środowisko dla bakterii fermentacji mlekowej. Ponadto, produkt ten jest matrycą wymagającą pod względem walorów fizykochemicznych, reologicznych i przechowalniczych. Proszę te uwagi potraktować dyskusyjnie. Wyjaśnienia również wymaga kwestia określenia „ogólna liczba organizmów/drobnoustrojów”, używane zarówno w sformułowanych hipotezach pracy, jak i konsekwentnie w wielu innych miejscach tekstu w języku polskim (np. s. 15, 18, 28, 29, 30, 33, 38). Mam wrażenie, że Autorka używa tego wyrażenia jako tożsamego z liczbą bakterii *L. rhamnosus* B 442, czy liczbą bakterii mlekowych. Wyrażenie „ogólna liczba drobnoustrojów”, używane szczególnie w odniesieniu do lodów, wskazuje na ocenę jakości mikrobiologicznej produktu i obejmuje wszystkie mikroorganizmy znajdujące w matrycy.

Interesująca jest propozycja trzech mieszanek lodziarskich, z wykorzystaniem bakterii *L. rhamnosus* B 442 w formie żywej kultury, liofilizatu oraz na bazie mleka fermentowanego tymi bakteriami. Takie badania są bardzo istotne z punktu widzenia aplikacyjnego, a ich wyniki stanowią podstawę dla stworzenia receptury produktu w ewentualnym dalszym etapie wdrożenia. Jestem także pod wrażeniem obszernego zakresu badań jakościowych i przechowalniczych lodów oraz wyczerpującego opisu i zaawansowanej statystycznie analizy wyników. Po lekturze tej części rozprawy nasuwa mi się kilka pytań, które nam nadzieję będą stanowić kanwę do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej. W opisie mylące jest określenie „lody fermentowane” i „lody niefermentowane”, co wskazuje na fermentację lodów jako gotowego produktu poddanego fermentacji (s. 18 i dalsze). Ze względu na wiodący temat dysertacji, szczególnie ważne jest prześledzenie „losów” bakterii *L. rhamnosus* B 442 w produkcji oraz skutków ich wprowadzenia do lodów. Proszę o wyjaśnienie stwierdzenia na stronie 33: „Na podstawie analizy żywotności bakterii, stwierdzono wyższą ich liczebność w lodach niż w przypadku hodowli startowej.” Czym można wyjaśnić wzrost liczebności bakterii w produkcji? Na stronie 37 Autorka pisze „Wykazano wysoką żywotność *L. rhamnosus* B 442, odpowiednią dla zachowania probiotycznych właściwości produktu.” Proszę o wyjaśnienia dotyczące poziomu bakterii niezbędnego do zapewnienia warunku „probiotyczności” produktu? Na tle obszernych badań parametrów lodów zawierających szczep bakterii wzbogacony w jony metali powstaje również pytanie o jednoznaczną ocenę, czy ich wprowadzenie poprawiało czy pogarszało walory reologiczne lodów.

W mojej opinii, oprócz wskazania optymalnych parametrów wzbogacenia bakterii *L. rhamnosus* B 442 w wybrane mikro- i makroelementy z wykorzystaniem technologii PFE, niewątpliwym efektem pracy o wysokim potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym są zweryfikowane eksperymentalnie receptury mieszanek lodziarskich. Ta część badań,

głęboko osadzona w technologii żywności, z powodzeniem może stać się zaczątkiem wprowadzenia na rynek lodów produktu przynoszącego dla konsumenta nie tylko hedonistyczną przyjemność, ale także pewne walory żywieniowe.

Za podstawę pracy przyjmuję zbiór siedmiu publikacji, które ukazały się w czasopismach naukowych o uznanej randze międzynarodowej. Wyniki badań są w publikacjach starannie opisane, udokumentowane i zilustrowane. Opatrzone są również właściwie dobraną bibliografią, która stanowi tło dla lokowania badań własnych i punkt odniesienia w przeprowadzonej dyskusji. Przypuszczam, że ze względu na szerokie opracowanie publikacyjne, Pani mgr Małgorzata Góral-Kowalczyk w polskojęzycznej części dysertacji nie zamieściła dyskusji wyników z danymi literaturowymi. Wskazane w tym opracowaniu 37 pozycji bibliografii stanowi tło dla części wprowadzającej oraz odniesienie do metodyki badań. Dysertacja zawiera 10 logicznych wniosków, które stanowią zwięzłe konkluzje pracy oparte na danych eksperymentalnych. Dyskusyjnie potraktowałabym jedynie zamieszczenie wniosku pierwszego na stronie 40: „Za najbardziej oporny na działanie jonów magnezu, cynku i selenu uznano szczep *Lactobacillus rhamnosus* B 442, który wykorzystano do dalszych analiz.” W mojej opinii, selekcja jest tu wstępnym działaniem metodycznym, a wybór szczepu nie jest efektem naukowym i nie wyjaśnia natury zjawiska. Mając na uwadze tytuł pracy, który wyraźnie wskazuje *L. rhamnosus* B 442 jako obiekt badań, wniosek 1 uważam za zbędny. Analogicznie, umieszczenie we wniosku siódmym (s. 41) oprócz *L. rhamnosus* B 442, szczepów *L. rhamnosus* 1937 i *L. lactis* JBB 500 wzbogaconych w magnez wymagałoby dodatkowego wyjaśnienia w świetle tytułu dysertacji.

Siedem publikacji zawiera łącznie 329 pozycji bibliografii z lat 1991-2019, przy czym około 15% powtarza się w większości artykułów. Wszystkie pozycje są ściśle związane z tematem, a większość obejmuje zagadnienie kluczowe dla obszaru badań prowadzonych przez Panią mgr Małgorzatę Góral-Kowalczyk. Pozycje pochodzące z lat 2015-2019 stanowią 40% piśmiennictwa, co wskazuje na dobrą znajomość aktualnej literatury problemu.

### **Uwagi edytorskie**

Poniżej zamieszczam kluczowe uwagi edytorskie, które nie umniejszają wartości pracy i przytaczam je z obowiązku recenzenta.

- W spisie treści w punktach 4.5. i 4.6. zawarto określenia „właściwości fizykochemiczne i mikrobiologiczne”. Proszę o wyjaśnienie, co kryje się pod określeniem „właściwości mikrobiologiczne”.
- Nie jest jasne sformułowanie na stronie 6: „Wykazano różnice we wszystkich parametrach fizykochemicznych, które były zależne od procesu produkcji lodów”.
- Na stronie 7 brak jest danych źródłowych publikacji PIV.



- Zapis na stronie 13: „Ze względu na dobre właściwości technologiczne najczęściej wykorzystywanymi bakteriami są szczepy *Lactobacillus*.” z pewnością jest skrótem myślowym użytym przez Autorkę. Proszę o doprecyzowanie czego dotyczą „właściwości technologiczne”.
- Użyte na stronie 15 i na kolejnych sformułowanie „pod wpływem działania wysokich stężeń metali” powinno być zastąpione określeniem „...metali w wysokim stężeniu”.
- W opisie wyników badań pojawia się często żargon laboratoryjny, np.: „szczep ten wykazywał niską biomasę w obecności jonów selenu” na stronie 20, czy „wzrost akumulacji  $Zn^{2+}$  w bakteriach” na stronie 24 oraz „w biomacie komórek poddanych działaniu PEF zaobserwowano istotne zmiany” na stronie 27.
- Na stronie 22 znajduje się niezbyt szczęśliwe sformułowanie: „4.2. Wpływ stężenia jonów w pożywce oraz optymalizacji parametrów PEF na koncentrację jonów w komórkach bakterii i zmiany biomasy”. Uważam, za duży skrót myślowy przypisywanie optymalizacji wpływu na jakieś zjawisko.
- Tytuł tabeli 2 (s. 29) „Wpływ stężenia magnezu w pożywce na przeżywalność *Lactobacillus rhamnosus* B 442.” nie jest zgodny z tytułem kolumny „Ogólna liczba mikroorganizmów (jtk/ml)”. Spodziewam się, że oznaczano liczbę bakterii *L. rhamnosus* B 442. Podobna uwaga dotyczy Tabeli 3 (s. 30).
- Określenie na stronie 34 „mleko fermentowane ... charakteryzowało się kwaśnym pH w zakresie 4,2- 4,3” jest niewłaściwe w odniesieniu do skali kwasowości.
- Proszę o wyjaśnienie twierdzenia „Proces fermentacji korzystnie wpłynął na ogólną zawartość mikroorganizmów.” na stronie 35.
- Proszę o doprecyzowanie określenia „świeżego szczepu bakterii” na stronie 35.
- Na stronie 38 Autorka pisze: „Pomimo spadku ogólnej liczby mikroorganizmów wyprodukowane lody wciąż mogą być uznane za produkt probiotyczny.” Proszę o wyjaśnienie jakich bakterii dotyczy to zdanie.
- Zwracam też uwagę na błędy w formacie spisu literatury: 1) niektóre tytuły czasopism nie są pisane wielkimi literami, np. Biological Trace Element Research, Physiological Reviews, 2) stosowanie zamiennie pełnych nazw i skrótów tytułów czasopism.

Biorąc pod uwagę formę dysertacji, gdzie jej podstawową i najważniejszą częścią jest siedem anglojęzycznych publikacji w czasopismach naukowych, mam świadomość trudności zarówno w skrótowym przedstawieniu pracy doktorskiej, jak i zmiany języka opisu. W tym świetle przedstawiona powyżej liczba uwag jest niewielka, a usterki nie wpływają istotnie na odbiór całej pracy.

### **Konkluzje recenzji**

W podsumowaniu stwierdzam, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a postawione hipotezy badawcze potwierdzone eksperymentalnie. Praca niesie istotny aspekt poznawczy, poszerzając stan wiedzy w zakresie fortyfikacji bakterii probiotycznych w mikro- i makroelementy. Zastosowanie techniki pulsacyjnego pola elektrycznego do modulowania cech mikroorganizmów jest interesujące również z aplikacyjnego punktu widzenia. W mojej opinii, kilkuparametryczna optymalizacja procesu bioakumulacji metali przez *L. rhamnosus* B 442 z wykorzystaniem PEF może stanowić podstawy do opracowania technologii produkcji biomasy bakterii bogatych w metaloproteiny. Propozycja produktu spożywczego zawierającego wzbogacone w jony metali żywe kultury tych bakterii wraz z wielokierunkową

oceną parametrów reologicznych, sensorycznych i trwałości produktu staje się również przyczynkiem do przyszłych działań wdrożeniowych, których pierwszy element jakim jest weryfikacja w skali laboratoryjnej został zrealizowany. Zamieszczone w tekście recenzji moje uwagi i sugestie, mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają wartości pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Góral-Kowalczyk.

Stwierdzam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa Pani mgr Małgorzaty Marty Góral-Kowalczyk spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia oraz przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Technologii Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Małgorzaty Marty Góral-Kowalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na kompleksowe podejście do postawionego celu badań, dojrzałe połączenie badań podstawowych i aplikacyjnych oraz wysoką wartość publikacyjną, rozprawę doktorską mgr Małgorzaty Marty Góral-Kowalczyk oceniam jako wyróżniającą się. Wniosek o wyróżnienie wraz z jego szczegółowym uzasadnieniem przedstawiam w osobnym piśmie.

*Artur Cwiślik - Styczeń 2016*

**prof. dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska**

Łódź, 2.06.2020

**Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Marty Góral-Kowalczyk  
nt. „Wpływ aplikacji pulsacyjnego pola elektrycznego na bioakumulację wybranych  
jonów metali w komórkach *Lactobacillus rhamnosus* B 442”**

wykonanej

na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności

*Promotor: dr hab. Urszula Pankiewicz, prof. uczelni*

*Promotor pomocniczy: dr hab. Monika Sujka, prof. uczelni*

Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z wnioskiem o wyróżnienie niniejszej pracy. W mojej  
opinii praca zasługuje na wyróżnienie z następujących powodów:

- Ze względu na kompleksowe podejście do postawionego celu badań, dojrzałe połączenie badań podstawowych i aplikacyjnych.
- Przedstawione badania istotnie poszerzają i uzupełniają wiedzę w zakresie metod fortyfikacji bakterii probiotycznych w mikro- i makroelementy.
- Wysoką wartość publikacyjną badań. Praca stanowi homogenny zbiór siedmiu monotematycznych publikacji w czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku wpływu *Impact factor* równym 20,688 (zgodnie z rokiem opublikowania).

*Alina Kunicka-Styczyńska*