

Prof. dr hab. Jacek Nowak,
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Pracownia Fermentacji i Biosyntezy
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Magdaleny Anny Michalak-Tomczyk pt.
"Fermentowany jarmuż (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) jako nowe źródło bakterii
kwasu mlekowego i substancji biologicznie aktywnych"
wykonanej pod kierunkiem profesora uczelni dr hab. Magdaleny Polak-Bereckiej
i dr Katarzyny Skrzypczak**

Warzywa kapustne charakteryzują się wysoką zawartością witamin i minerałów, zawierają wiele cennych związków bioaktywnych. Zazwyczaj cechują się wysoką wartością odżywczą, choć niską kalorycznością i wysoką aktywnością przeciwutleniającą. Warzywa należące do rodziny kapustowatych, są postrzegane jako produkty o dużym znaczeniu w profilaktyce nowotworowej. Na szczególną uwagę zasługuje jarmuż (*Brassica oleracea*), który charakteryzuje się wysokimi walorami odżywczymi i prozdrowotnymi, a mimo to jest warzywem mało popularnym w Polsce, jednak zainteresowanie tym warzywem po latach zapomnienia, znów wzrasta. Ja osobiście jako młodzieniec, często spożywałem w domu rodzinnym zupełnie z jarmużu, hodowanego w ogródku działkowym, dlatego z tym większym zainteresowaniem przestudiowałem pracę doktorską mgr M. Michalak-Tomczyk. Jest udowodnione, że obróbka kulinarna wpływa znacząco na tkanki roślinne i obecne w nich substancje bioaktywne, dlatego propozycja zastosowania fermentacji budzi we mnie duży entuzjazm, jako, że produkty fermentowane, pomimo swych niekwestionowanych, wysokiej jakości zdrowotnej są słabo zbadane. Procesy wzrostu odpowiednich drobnoustrojów w trakcie procesu fermentacji mogą pozytywnie wpłynąć na uwalnianie związków biologicznych i zwiększyć ich biodostępność ale może także spowodować degradację składników chemicznych. Należy również podkreślić, perspektywy probiotycznego działania, znajdujących się w niepasteryzowanym produkcie mikroorganizmów, głównie bakterii kwasu mlekowego.

Ocena formalnej strony pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska pt. Fermentowany jarmuż (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) jako nowe źródło bakterii kwasu mlekowego i substancji biologicznie aktywnych" obejmuje blisko 50-cio stronicowe opracowanie z dołączonym, zbiorem czterech

publikacji naukowych. Prace te ukazały się w latach 2018-2020 w takich renomowanych czasopismach takich jak: Microbiological Research, Journal of Functional Foods, Food Bioscience i Applied Sciences, wydawanych przez Elseviera (P1 – P3) i MDPI (płatne, open access) (P4).

Ten wskazany, jednotematyczny cykl publikacji, zgodnie z punktacją MNiSW przynosi 265 punkty według roku wydania publikacji, a łączny IF, według Journal Citation Report zgodny z rokiem opublikowania wynosi 12,94.

Wszystkie publikacje zostały wydane w języku angielskim i we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem. Z dołączonej dokumentacji wynika, że indywidualny wkład mgr inż. Magdaleny Michalak-Tomczyk wynosi od 55-70% i dotyczy zarówno opracowania koncepcji badań jak i wykonania doświadczeń oraz opracowaniu i interpretacji wyników i pisaniu manuskryptu. Prace dla łatwości opisu i dyskusji nazwano P1 (Comparison of lactic acid bacteria during spontaneous curly kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) fermentation), P2 (Fermented curly kale as a new source of gentisic and salicylic acids with antitumor potential), P3 (Starter culture for curly kale juice fermentation selected by principal component analysis) i P4 (Possibility of using fermented curly kale juice to manufacture Feta-type cheese). Autoreferat pracy w języku polskim obejmuje streszczenie (również w języku angielskim), wykaz publikacji wchodzących w skład pracy (9 stron) oraz wprowadzenie i hipotezy badawcze i cel pracy (5 stron). Na część opisową składa się rozdział Materiał i metody (6 stron) i Wyniki i dyskusja (23 strony). Podsumowanie i wnioski w liczbie 9-ciu przedstawiono na 2-óch stronach. Literatura użyta do przygotowania autoreferatu liczy 58 dobrze dobranych i prawidłowo napisanych pozycji co świadczy o jej dobrej znajomości literatury przedmiotu i umiejętności właściwego doboru publikacji do dyskusji swoich wyników.

Część metodyczna jest opisana dość skrótowo, żeby nie powiedzieć lapidarnie, co wynika z użycia dużej liczby nowoczesnych metod, ale wymagało od czytelnika uzupełnienia informacji w tekście publikacji. Przy okazji proszę o wyjaśnienie dlaczego po zastosowaniu dłuższej, tradycyjnej fermentacji w 5-cio litrowych pojemnikach (P1 i P2), inne badania wykonano na rozcieńczonym wodą soku przez 72 h. Proszę również o wyjaśnienie pochodzenia szczepu referencyjnego.

Do opisu i dyskusji wyników oraz sformułowania wniosków nie mam uwag. Co prawda autorka nie ustrzegła się drobnych błędów w tekście (np. str 10 w.5, str.17, w 9. od dołu), stylistycznych (p.3.8 odmiana), spadek zamiast obniżenie wartości, ale nie

przeszkadzają one w lekturze tekstu, który jest bardzo dobrze napisany. Dyskusja jest profesjonalna, a wnioski sformułowane prawidłowo.

Ocena merytoryczna pracy

Pierwsza publikacja (P1) dotyczy identyfikacji autochtonicznej mikroflory fermentowanego jarmużu. Wstępnie wyizolowano 88 izolatów bakterii o cechach fenotypowych charakterystycznych dla LAB, a następnie 10 wybranych zidentyfikowano używając techniki opartej na sekwencjonowaniu genu 16S rRNA oraz techniki MALDI-TOF MS. Bardzo interesującą dla mnie częścią przedstawionych w tej publikacji badań było określenie występowania zróżnicowanych gatunków bakterii w poszczególnych etapach spontanicznej fermentacji jarmużu i podobieństwo następstwa kolejnych gatunków jak w innych fermentacjach spontanicznych surowców pochodzących z rodziny *Brassica*. Bardzo ciekawe i korzystne wyniki dała również ocena właściwości funkcjonalnych izolatów z których *Lactobacillus brevis* R413 może być szczególnie interesujący jako perspektywiczny probiotyk.. Wykazano po raz pierwszy w literaturze przedmiotu, że produkt fermentowany z jarmużu jest dobrym źródłem bakterii fermentacji mlekowej, o interesujących cechach funkcjonalnych. Chciałem zapytać tutaj o cechy sensoryczne tego produktu, o których ani w pracach ani w autoreferacie się nie wspomina.

Jestem pod bardzo dużym pozytywnym wrażeniem zarówno koncepcji pracy, jak i wykonania analiz i uzyskanych wyników. Zresztą jako wielkiemu zwolennikowi fermentowanych produktów, które w dużej mierze są jeszcze niewystarczająco przebadane, publikacja P1 i P2 bardzo się podobała i chciałem tutaj pogratulować autorom, którzy wpisali się w aktualny, bardzo ważny trend, dokumentowania pozytywnego wpływu fermentacji bakteriami kwasu mlekowego, na cechy żywieniowe surowców roślinnych.

Publikacja P2 poświęcono ocenie obecności i przemianom wybranych związków fenolowych podczas procesu spontanicznej fermentacji jarmużu. Największą nowością naukową było odkrycie podczas analizy kwasów fenolowych, występowania kwasu gentyzynowego, którego obecności w warzywach kapustowatych dotychczas w literaturze nie opisano. Bardzo interesujące były też badania zdolności konwersji kwasu gentyzynowego i salicylowego przez drobnoustroje podczas 50-cio dniowej fermentacji. Wykonana została również, z zastosowaniem komórek linii nowotworowych (SW620 i HT29), ocena aktywności przeciwnowotworowej tych kwasów. Wykazano, że biokonwersja naturalnych polifenoli w czasie fermentacji prowadzonej przez bakterie kwasu mlekowego prowadzi do poprawy cech prozdrowotnych produktu.

Należy moim zdaniem podkreślić, że publikacje P1 i P2 wykonano bez grantowego wsparcia finansowego, podczas gdy wielu młodych badaczy uważa, że bez oparcia się na grantach nie można opublikować bardzo dobrych prac.

Publikacja P3, wykonana bardzo solidnie i z zastosowaniem nowoczesnych metod analitycznych i matematycznych budzi moje największe wątpliwości, nie merytoryczne, ale związane z założeniem (zastosowanie rozcieńczonych wodą soków z jarmużu). Oczywiście skrócenie fermentacji z kilkudziesięciu dni do 72 godzin, umożliwiło wykonanie wielu hodowli (fermentacji) jednak moje własne doświadczenia z opracowaniem mieszanki „superkultur”, skończyły się niepowodzeniem. Gratuluję więc i metody dojścia do takiej kultury starterowej i wyniku: polepszonych cech technologicznych tej mieszanej kultury. Z zainteresowaniem oczekuję też odpowiedzi na pytanie: jak ta kultura starterowa „wypadła” przy zastąpieniu fermentacji spontanicznej, fermentacją kierowaną. Takie projektowane, kultury starterowe są powszechnie stosowane np. w Kanadzie do fermentacji kapusty, ale zastosowane przez nas i porównane z polską kapustą spontanicznie fermentowaną wypadły blado. Również próby stworzenia kultury starterowej dla utylizacji gorących ścieków z przemysłu spożywczego (projekt realizowany w ramach projektów Unii Europejskiej Framework Program V), nie przyniósł sukcesów technologicznych. Ale cieszę się, że doktorantka podjęła się tak trudnych badań, jak praca z kulturami mieszanymi.

W publikacji P4, odczuwa się dążenie autorów do zastosowania uzyskanego produktu (soku fermentowanego) w rzeczywistości produkcyjnej (przemysłowej). Moje doświadczenie, jako recenzenta, pokazuje, że takich prób w pracach doktorskich (nie poświęconych technologii) nie jest zbyt wiele. Praca jest ciekawa i profesjonalnie przeprowadzona (techniki i metody oceny), a dotyczy możliwości zastosowania fermentowanego (z użyciem opracowanej wcześniej kultury starterowej składającej się z 3 szczepów LAB) soku z jarmużu do produkcji sera typu Feta. Uzyskano potwierdzenie takiej możliwości przy poziomie dodatku soku 5% (v/v) do mleka krowiego z dodatkiem 0.02% CaCl₂. Zauważono, że wykorzystanie tego soku wzmacnia działanie podpuszczki, prowadząc do uzyskania stabilniejszego skrzepu serowego, a otrzymany ser charakteryzował się „zmienionymi cechami fizykochemicznymi, teksturą, składem aminokwasowym, profilem kwasów tłuszczowych oraz mikrostrukturą”. W publikacji przyznano jednak uczciwie, że należy w przyszłości przeprowadzić badania konsumenckie uzyskanego produktu.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca porusza bardzo interesujące, a dotychczas słabo przebadane tematy badawcze. Po raz pierwszy opublikowane są dobrze udokumentowane informacje o spontanicznej fermentacji jarmużu. Bardzo ważne jest odkrycie występowania w fermentowanym produkcie z jarmużu kwasu gentyzynowego i wykazanie jego cech prozdrowotnych oraz możliwości hamowania rozwoju komórek rakowych (na liniach komórek tkankowych tkankowych). Sukcesem, który należałoby potwierdzić z użyciem produktu fermentowanego (kiszonki z jarmużu) jest stworzenie kultury starterowej o bardzo dobrych cechach technologicznych. Próby zastosowania fermentowanego soku do sera typu Feta, pokazują możliwości zastosowania tego produktu w wytwarzaniu żywności pochodzenia zwierzęcego.

Analizując pracę doktorską miałem odczucie, że autorem jest doświadczony i świadomy tego co robi badacz. Pani mgr inż. Magdalena Michalak-Tomeczyk bardzo swobodnie porusza się w procesie doboru zaawansowanych metod analitycznych i metod oceny uzyskanych wyników. Zastanawiało mnie to i po uzyskaniu dodatkowych informacji zdałem sobie sprawę, że mam mimo młodego wieku Doktorantki, mam do czynienia z bardzo doświadczonym badaczem i bardzo aktywną organizacyjnie osobą. Jej aktywność na polu nauki rozpoczęła się już w czasie studiów w naukowym ruchu studenckim. Ta dynamiczna działalność przełożyła się na opublikowanie jako współautor oprócz prac będących składową doktoratu, również 8-miu innych publikacji, a także rozdziałów w 13 monografiach. Do tego dochodzi autorstwo 15 sekwencji nukleotydowych w bazie GenBank. Doktorantka wygłosiła referaty na 21 konferencjach naukowych w tym 9 zagranicznych w języku angielskim. Oprócz wielu wyróżnień uzyskanie grantu z dotacji MNiSW na prowadzenie badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich (2016-2018) wydaje mi się najważniejsze. Biorąc pod uwagę wysoką jakość publikacji składających się na doktorat i dodatkowo uzyskane informacje, mogę sformułować poniższy wniosek.

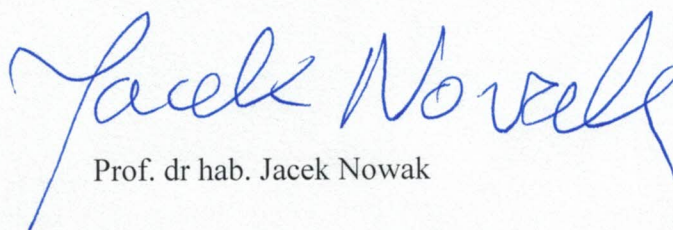
Wniosek końcowy

Uważam, że przygotowany jako praca doktorska, zbiór czterech spójnych tematycznie publikacji opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu światowym, prezentuje bardzo wysoki stopień kompleksowości i jakości zastosowanych metod, co składa się na wysoki poziom

naukowy doktoratu. Prace charakteryzują się właściwie zaplanowanym i przeprowadzonym postępowaniem naukowym, zakończonym profesjonalnie zaplanowaną i przetestowaną, propozycją technologii z perspektywą zastosowań przemysłowych. W pracy zamieszczono bardzo bogaty i dobrze przedstawiony materiał faktograficzny przygotowany z użyciem wielu, nowoczesnych, zaawansowanych metod badawczych. Wyniki badań noszą znamiona oryginalności i nowości naukowej. Odnosi się to szczególnie do opisu nowego produktu fermentowanego z jarmużu, wraz z charakterystyką następstwa drobnoustrojów w czasie spontanicznego procesu, opublikowania po raz pierwszy w literaturze występowania w otrzymanej kiszonce z jarmużu kwasu gentyzynowego i opisu jego cech prozdrowotnych, skomponowania mieszanej kultury starterowej o bardzo dobrych cechach technologicznych, a następnie propozycji jej użycia (sok fermentowany) w technologii sera typu Feta.

Mogę więc stwierdzić jednoznacznie, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Magdaleny Anny Michalak-Tomczyk odpowiada wymaganiom ustawowym stawianym rozprawom na stopień doktorski i proszę Radę Dyscypliny Naukowej Technologii Żywności i Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o jej dopuszczenie do publicznej obrony. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. Uzasadnienie wyróżnienia dołączam do oceny rozprawy.

Poznań, 4.02.2021



Prof. dr hab. Jacek Nowak