



Lublin, 20.02.2021 r.

dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ścisieł, prof. UMCS
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

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 w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka,
Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii,
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem promotora dr hab. Magdaleny Polak-Boreckiej, prof. uczelni
i promotora pomocniczego dr Katarzyny Skrzypczak

Oceniana rozprawa doktorska przedstawia bardzo wartościowe wyniki badań o charakterze aplikacyjnym i podstawowym uzyskane dzięki pomysłowi znalezienia nowego źródła bakterii kwasu mlekowego oraz wykorzystania tych bakterii do produkcji żywności funkcjonalnej. Mocną stroną ocenianej rozprawy jest wprowadzenie wielu elementów nowości do cieszącego się szerokim zainteresowaniem tematu fermentacji przeprowadzanej przez bakterie fermentacji mlekowej (LAB). Doktorantka wybrała na substrat poddawany procesowi fermentacji jarmuż - roślinę, którą dotąd nie poddawano takiemu sposobowi przetwarzania, mimo bliskiego pokrewieństwa tej rośliny z innym przedstawicielem rodzaju *Brassica* – kapustą głowiastą. Poddanie *Brassica oleracea* var. *sabellica* spontanicznej fermentacji było początkiem szeregu działań zmierzających do komercyjnego wytwarzania żywności funkcjonalnej o cennych prozdrowotnych właściwościach. Mgr Magdalena Anna Michalak-Tomczyk nie poprzestała na spontanicznej fermentacji jarmużu, ale posłużyła się nią w celu uzyskania izolatów mikroorganizmów o najlepszych cechach i opracowania składu ko-kultury starterowej o optymalnym składzie, która zapewniłaby uzyskiwanie fermentowanego produktu o stabilnych właściwościach.

Opracowanie nowych technologii było możliwe dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik badawczych właściwie dobranych, dobrze opanowanych i wykorzystanych w celu dogłębnego poznania procesu fermentacji jarmużu oraz oceny właściwości produktów żywnościowych tworzonych przy użyciu ko-kultur starterowych oraz z zastosowaniem soku po fermentacji jarmużu. Fermentowany sok z jarmużu użyto do otrzymania sera Feta, czyli produktu żywnościowego wytwarzanego z substratu pochodzenia zwierzęcego, w celu optymalizacji etapu koagulacji białka mleka. Sok uzyskany z nowatorsko poddanej fermentacji *Brassica oleracea* var. *sabellica* istotnie wpłynął na jakość wytwarzanego sera Feta, w tym na profil aminokwasów i kwasów tłuszczowych zawartych w tym serze.

Do najważniejszych i najcenniejszych elementów ocenianej pracy doktorskiej należy zbadanie właściwości prozdrowotnych (przeciwzapalnych i antynowotworowych) wybranych kwasów fenolowych znalezionych w fermentowany jarmużu. Kwasy te wytypowano po przeanalizowaniu profilu substancji biologicznie czynnych wytwarzanych podczas fermentacji.



Dostrzeżono, że profil ten podlega w procesie fermentacji dynamicznym zmianom. Za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF, sekwencjonowania genu 16S rRNA i amplifikacji genu *recA* wykazano zachodzenie zmian w składzie mikrobioty fermentowanego jarmużu podczas 42-dniowego procesu.

Analiza głównych składowych (PCA) pozwoliła na ocenę izolatów na podstawie danych o ich właściwościach technologicznych i funkcjonalnych. Metody LC-MS i HPLC posłużyły do przeanalizowania zmian składu związków fenolowych, a szczególnie kwasu gentyzynowego i salicylowego. Kwasy te przebadano pod względem ich cytotoksyczności wobec linii komórkowych. Poddano też analizie szereg czynników immunologicznych: stężenie interleukin i NO oraz aktywność cyklooksygenazy. Ponadto określono zmiany morfologiczne zachodzące pod wpływem tych kwasów w liniach nowotworowych. W trakcie fermentacji wykazano, po raz pierwszy dla roślin z rodziny *Brassicaceae*, obecność kwasu gentyzynowego, którego stężenie wzrastało wraz z okresem fermentacji. Doktorantka stwierdziła aktywność przeciwnowotworową kwasów gentyzynowego i salicylowego oraz ich wpływ na morfologię komórek nowotworowych. Kwasy te przy niewielkich stężeniach obniżały liczbę komórek nowotworowych raka okrężnicy dwóch testowanych linii. Hamowały one także ekspresję czynników prozapalnych (interleukiny $IL-1\beta$, tlenku azotu, leukotrienów cysteinowych, prostaglandyny E2). Doktorantka wykazała, że fermentacja przeprowadzona z użyciem ko-kultury szczepów pozwalała uzyskać produkt o znacznie lepszych właściwościach niż produkt otrzymywany przy użyciu pojedynczych szczepów. Jarmuż fermentowany przez ko-kulturę miał wyższą aktywność przeciwutleniającą oraz antybakteryjną wobec enteropatogenów.

Nowatorskie było nie tylko zastosowanie fermentowanego jarmużu w mleczarstwie, ale także uzyskanie funkcjonalnych właściwości otrzymanego produktu – sera Feta o zwiększonej zawartości aminokwasów i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Fermentowany sok z jarmużu ponadto skracał czas tworzenia skrzepu i zwiększał jego stabilność.

Na szczególne podkreślenie zasługuje ogromna liczba metod z zakresu biologii molekularnej, mikrobiologii i technologii żywności czy technik mikroskopowych wykorzystanych na poszczególnych etapach pracy. Ciekawym etapem było monitorowanie dynamiki wytwarzania skrzepu kwasowego z zastosowaniem technik reologicznych przy użyciu reometru Kinexus, rejestrowanie zmian modułu zachowawczego i modułu stratności oraz stabilności skrzepu za pomocą aparatu Turbiscan. Cenne i świadczące o doskonałym opanowaniu technologii produkcji jest przedstawienie etapów wytwarzania sera typu Feta za pomocą schematu.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny A. Michalak-Tomczyk stanowi doskonały przykład wykorzystania mikroorganizmów autochtonicznych wyizolowanych z naturalnego środowiska.

Ko-kultura starterowa została opracowana po przeprowadzeniu prac optymalizacyjnych dla 10 izolatów, które przyporządkowano do pięciu (5) odrębnych rodzajów: *Weissella* (dwóch gatunków *W. hellenica* i *W. cibaria*), *Lactobacillus* (czterech gatunków *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. brevis*), *Pedococcus* (dwóch gatunków *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*) oraz reprezentowany przez jeden szczep *Lactococcus* (*L. lactis*) i *Leuconostoc* (*L. mesentericus*). Bardzo ważnym osiągnięciem było wykazanie odrębnego składu gatunkowego szczepów bakterii w kolejnych fazach spontanicznej fermentacji: wczesnej (dzień 1.), burzliwej (dzień 4.) i cichej (w dniu 21. i 42.), w których obserwowano stopniowe zakwaszenie i silne ograniczenie różnorodności w ostatnim 42. dniu fermentacji. Jako składniki kultury starterowej do efektywnej fermentacji jarmużu zapewniającej uzyskiwanie stabilnego



produktu wybrano tylko trzy izolaty należące do gatunków: *Lb. paraplantarum*, *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus*.

Przyjęto, że optymalny skład ko-kultury starterowej o właściwościach probiotycznych zostanie dobrany na podstawie analizy szeregu cech adaptacyjnych i funkcjonalnych: oporności na wysokie stężenie NaCl, obecność żółci oraz niskie wartości pH wynikające ze zwiększonej produkcji kwasów, zwłaszcza kwasu mlekowego działającego konserwująco i antybakteryjnie. Z kolei szczepy-kandydaci do kultury starterowej nie powinny wykazywać oporności na antybiotyki i izolaty z fermentowanego jarmużu spełniały ten warunek wykazując tylko naturalną oporność na kwas nalidyksowy, streptomycynę i kanamycynę. Fermentowany sok powstały w wyniku zastosowania ko-kultury wykazywał silną aktywność antymikrobiologiczną w stosunku do enteropatogenów *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* a nieco słabszą w stosunku do *Staphylococcus aureus*.

Określono również aktywności enzymatyczne wykluczając obecność aktywności β -glukuronidazy o działaniu kancerogennym. Wśród wielu aktywności potwierdzonych za pomocą testu API ZYM stwierdzono aktywność β -glukozydazy zwiększającej biokonwersję glikozydów izoflawonów oraz ważną u bakterii probiotycznych zmniejszającą nietolerancję pokarmową aktywność β -galaktozydazy ułatwiającą trawienie laktozy. Wzięto także pod uwagę ważną cechę bakterii jaką jest zdolność adhezji do nabłonka jelitowego oszacowaną w teście adhezji do ksylenu z wyznaczeniem zakresu hydrofobowości w przedziale ok. 30-45%.

Do niezwykle ważnych osiągnięć niniejszej pracy należy wykazanie bardzo silnych (przy niemal 10-krotnie niższych stężeniach niż u innych badaczy) zdolności hamowania wzrostu komórek linii komórkowej glejaka przez kwas gentyzynowy. Kwas ten wykazywał właściwości przeciwzapalne w niskich stężeniach i okazał się dobrym inhibitorem leukotrienów cysteinowych (CysLT) redukując liczbę komórek nowotworowych o 40%. Natomiast wraz ze wzrostem innego związku fenolowego - kwasu salicylowego obserwowano niemal dziesięciokrotny spadek uwalniania przez linię nowotworową SW620 czynnika prozapalnego jakim jest NO. W tej linii ludzkich komórek nowotworowych kwas gentyzynowy hamował ekspresję IL-1 β .

Ocena układu rozprawy doktorskiej i formalnej strony

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Anny Michalak-Tomczyk przygotowana została jako **cykl czterech publikacji doświadczalnych** opublikowanych w latach 2018 (jedna publikacja) i 2020 (trzy publikacje).

Podkreślić należy, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych, i co także ważne, w różnych czasopismach z listy JCR (*Microbiological Research, Journal of Functional Food, Applied Sciences, Journal Citation Reports*) o bardzo wysokich współczynnikach wpływu oraz wysokiej punktacji MNiSW. Sumaryczna wartość współczynnika IF dla tych prac wyniosła 12,943 (średni IF=3,236) i 265 punktów MNiSW (średnio 66,25). We wszystkich publikacjach składających się na cykl, będący podstawą rozprawy, Doktorantka jest **pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym**, a ponadto zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami, miała Ona bardzo duży 55, 60, 65 i 70% udział w tworzeniu tych publikacji. We wszystkich pracach recenzowanego cyklu mgr Magdalena Anna Michalak-Tomczyk była współautorem koncepcji, brała udział w opracowaniu założeń, realizowała badania laboratoryjne, analizowała wyniki, formułowała wnioski i redagowała manuskrypt, co świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Autorki. Jednocześnie skład autorski tych publikacji wskazuje na duże wsparcie i współdziałanie



zespołu badawczego w realizacji badań, których wyniki zawarte są w niniejszej rozprawie doktorskiej. Wysoka jakość publikacji wskazuje na bardzo dużą wiedzę Doktorantki i zainteresowanie tematem, a zarazem na doświadczenie oraz wysokie umiejętności zespołu autorów w pisaniu tego typu prac. Wyraźnie widoczne jest, że doświadczenia zostały bardzo dobrze zaplanowane i rzetelnie wykonane. Poszukiwanie nowych rozwiązań było możliwe przy właściwym doborze metod badawczych, co zaowocowało spektakularnymi wynikami. Publikacje składające się na cykl, są bardzo dobrze i starannie przygotowane, zawierają przejrzystą, właściwie dobraną do prezentowania określonego typu wyników dokumentację graficzną, w tym dokumentację fotograficzną badań mikroskopowych zastosowanych do zobrazowania zmian morfologicznych. Podobnie wysoką jakością jak publikacje odznacza się cała rozprawa. Autorka potrafiła w bardzo przystępnej, syntetycznej formie przedstawić całość zagadnienia, naświetlić cele i przebieg badań oraz podkreślić ważność uzyskanych wyników, wskazując na wkład w badania podstawowe jak i w rozwój technologii produkcji żywności.

Dokumentacja zawarta w publikacjach objęła 14 tabel i 20 rysunków, w tym przedstawiające zdjęcia mikroskopowe. Natomiast w rozprawie zamieszczono 5 tabel i 11 rysunków. Cały materiał graficzny został wyraźnie opisany, a większość zawartych w nim wyników została poddana analizie statystycznej dla podkreślenia istotności ich różnic.

W rozprawie Doktorantka zacytowała 56 publikacji. Natomiast przegląd wiedzy zaprezentowany w publikacjach został przeprowadzony na podstawie 214 wartościowych, dobrze dobranych pozycji literatury. W kolejnych pracach doświadczalnych Doktorantka odwołała się, odpowiednio, do 58, 52, 43 i 61 publikacji.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Anny Michalak-Tomczyk jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań, a na podkreślenie zasługuje bardzo duża syntetyczność, systematyczność i przejrzystość wynikająca z właściwie przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy.

Rozprawa doktorska zawiera, poza cyklem publikacji poprzedzonych spisem i danymi biometrycznymi oraz streszczeniem i abstraktem, 6 rozdziałów: (I) wprowadzenie, (II) hipoteza badawcza i cel; (III) materiały i metody i (IV) wyniki i dyskusja (V) podsumowanie i wnioski, (VI) literatura

Doktorantka sformułowała hipotezy, które weryfikowała dążąc do osiągnięcia szczegółowych celów badawczych. Autorka rozprawy doktorskiej wytyczyła także, co bardzo ważne, nadrzędny cel pracy.

Dążąc do osiągnięcia postawionych celów Doktorantka wykorzystwała szereg nowoczesnych narzędzi badawczych oraz metod bardzo dobrze dobranych i zmodyfikowanych na potrzeby badań własnych.

Doktorantka w rozprawie w sposób klarowny nie tylko przedstawiła uzyskane wyniki, ale także bardzo dojrzałe je zinterpretowała i porównała z wynikami innych badaczy.

Autorka syntetycznie podsumowała badania podkreślając największe osiągnięcia recenzowanej pracy formułując zarówno wnioski szczegółowe jak i wniosek ogólny.

Reasumując recenzowana rozprawa doktorska jest kompleksowym opracowaniem, którego niewątpliwym osiągnięciem jest uzyskanie nowego źródła bakterii LAB i ich metabolitów o bardzo ważnych cechach funkcjonalnych. Na szczególne podkreślenie w rozprawie doktorskiej mgr Magdaleny A. Michalak-Tomczyk zasługuje nowatorski pomysł, nowoczesne, adekwatne do założonego celu i zróżnicowane metody, wysoka jakość publikacji, w których przedstawione zostały uzyskane wyniki.



Wyniki opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej mają znaczący wkład w tworzenie efektywnej technologii produkcji żywności funkcjonalnej z substratów roślinnych i zwierzęcych. Są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż otwierają perspektywy praktycznego zastosowania metabolitów czynnych oraz wybranych izolatów jako kultur starterowych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny A. Michalak-Tomczyk prezentuje pełen opis zaawansowanej biotechnologii, która powinna jak najszybciej znaleźć powszechne zastosowanie, aby dostarczyć cennych związków aktywnych i rozszerzyć dietę o cenną żywność funkcjonalną w postaci fermentowanego jarmużu produkowanego z wykorzystaniem ko-kultur a zatem daje oryginalne rozwiązanie bardzo istotnego problemu badawczego. Opisane w rozprawie doktorskiej wyniki zgodnie z postawioną hipotezą potwierdziły, że fermentowany przez autochtoniczną mikrobiotę jarmużu jest cennym nowym źródłem LAB i związków biologicznie aktywnych. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Anny Michalak-Tomczyk znacząco poszerzyły wiedzę na temat aplikacyjnych zastosowań fermentacji różnych, nieznanych pod tym względem substratów roślinnych, jak również uświadomiły celowość testowania nowych zastosowań fermentowanych roślin do wytwarzania żywności funkcjonalnej o cennych właściwościach medycznych i technologicznych.

Na wyróżnienie zasługują bardzo dobrze dobrane modele doświadczalne (jarmuż jako źródło autochtonicznego mikrobiomu, izolaty bakterii kwasu mlekowego) oraz techniki doświadczalne, które poddano odpowiednim modyfikacjom. Wysoka jakość opublikowanych prac będących podstawą rozprawy doktorskiej wskazuje, że Doktorantka doskonale opanowała techniki mikrobiologiczne, molekularne, biochemiczne i technologiczne, a stosując je w pełni wywiązała się z zadań, jakie zostały postawione w hipotezie i celach pracy.

Recenzowana praca napisana została w sposób wskazujący na dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną, dążenie do rozwiązywania problemów o charakterze aplikacyjnym oraz umiejętność interpretacji wyników, ich syntetycznego przedstawienia oraz wnikliwej, twórczej dyskusji.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Anny Michalak-Tomczyk nasuwają się tylko drobne uwagi:

Wprowadzcie na wykresach i w tabelach zaznaczono odchylenia standardowe od prezentowanych średnich wartości wyników, albo wprowadzono literowe oznaczenia istotności różnic, co świadczy o poddaniu wyników analizie statystycznej, ale Autorka powinna w rozprawie zamieścić podrozdział opisującym zastosowane metody statystyczne w rozdziale Materiał i metody. Poza tym w tytułach materiału graficznego, w którym prezentowane są wyniki, powinno znaleźć się odniesienia do analizy statystycznej, jakiej poddane zostały wyniki prezentowane w tabelach lub za pomocą wykresów. W rozdziale Materiał i metody powinno być także odniesienie do metod mikroskopowych jakie wykorzystano do wizualizacji produktów czy komórek.

Zdecydowanie Autorka nie powinna używać w rozprawie doktorskiej pojęcia „mikroflora” w stosunku do autochtonicznych mikroorganizmów. Pojęcie „mikroflora” nawiązuje do dawnej systematyki zaliczającej mikroorganizmy do królestwa roślin i należy zastąpić je słowami mikroorganizmy, mikrobiota lub mikrobiom.

Niniejsze uwagi, mają charakter marginalny i nie umniejszają zupełnie wartości rozprawy.



Chciałabym prosić Doktorantkę o odpowiedzi na pytania nawiązujące do przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników:

W rozprawie zaproponowano skład kultury starterowej zawierającej zaledwie trzy izolaty: *Lb. paraplantarum*, *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus*. Czy nie byłoby wskazane w kulturze starterowej łączyć 2-3 izolaty o optymalnych cechach z przedstawicielem innego rodzaju np. *Weisella* czy *Lactococcus* w celu uzyskania odmiennych produktów fermentacji o nowych cechach?

Intensywnym testom poddano dwa z licznych związków fenolowych pojawiających się w fermentowanym jarmużu. Które ze związków fenolowych poza kwasem gentyzynowym i salicylowym według wiedzy Doktorantki mogłyby mieć podobne funkcjonalne oddziaływanie lub wносить inne ciekawe biologicznie cechy?

Jak dobrano okres fermentacji i czy jego przedłużenie 42-dniowej fermentacji o kolejne dni jest technologicznie możliwe i prowadziłyby do wytworzenia produktów o nowych cechach? Czy dla przeprowadzenia długotrwałej fermentacji kultura starterowa powinna być dobrana na podstawie składu autochtonicznej mikrobioty pojawiającej się w późnym okresie fermentacji?

Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Michalak-Tomczyk jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Anny Michalak-Tomczyk zatytułowana „Fermentowany jarmuż (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) jako nowe źródło bakterii kwasu mlekowego i substancji biologicznie aktywnych”, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz **spełnia wymogi** Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016 r. poz. 882 ze zm.) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich i habilitacyjnych oraz w postępowaniu o nadanie tytułu naukowego (Dz. U. z 2016 r. poz. 1586) i przeprowadzany jest na zasadach dotychczasowych – w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie technologia żywności i żywienia – w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - przepisy wprowadzające Ustawę prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669).

W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie **wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Anny Michalak-Tomczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy Autorki wnioskuję **o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Anny Michalak-Tomczyk stosowną nagrodą.**

dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ściseł, prof. UMCS