

Prof. dr hab. Maria Śmiechowska, prof. zw. UMG
Katedra Towaroznawstwa i Zarządzania Jakością
Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa
Uniwersytet Morski w Gdyni

Gdynia, 14.08.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Izabeli Podgórskiej-Kryszczuk**

pt.: „Drożdże jako czynnik ograniczania grzybów z rodzaju *Fusarium* w żywności”
wykonanej pod kierunkiem naukowym

promotora – prof. dr hab. Ewy Solarskiej

oraz

promotora pomocniczego – dr hab. Moniki Kordowskiej-Wiater.

Podstawą przygotowania recenzji jest pismo Pani Dziekan Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii prof. dr hab. Izabeli Jackowskiej z dnia 01. 07.2019 r.

Niniejsza recenzja sporządzona została zgodnie z art. 25. 1-3 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789) oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r., poz. 261, art. 18).

Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego

Zapewnienie jakości i bezpieczeństwa to jedno z najważniejszych zadań w obszarze żywnościowo-żywnościowym. W ocenie jakości i bezpieczeństwa żywności stosuje różne kryteria: fizyczne, chemiczne, sensoryczne i mikrobiologiczne. Stan mikrobiologiczny żywności wpływa na jej walory i odgrywa ważną rolę w całym łańcuchu „od pola do stołu”.

Do mikroorganizmów o dużym znaczeniu w zapewnieniu jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności należą grzyby z rodzaju *Fusarium*. Badania nad tymi organizmami są prowadzone od wielu lat i początkowo skupiały się na ich rozpoznaniu, określeniu warunków występowania, aspektach zdrowotnych i toksykologicznych dla roślin, zwierząt i ludzi. Najnowsze badania dotyczą poszukiwania metod ich zwalczania. Walkę z grzybami z rodzaju *Fusarium* można prowadzić metodami chemicznymi za pomocą silnie działających środków o działaniu przeciwgrzybowym, jednak stosowanie tych środków nie jest obojętne dla ludzi, zwierząt i środowiska.

Ponadto, substancje chemiczne wykorzystywane do zwalczania grzybów z rodzaju *Fusarium* są zabronione w rolnictwie ekologicznym. Dlatego coraz częściej podejmowane są prace badawcze nad zastosowaniem metod biologicznych w ochronie żywności przed grzybami z rodzaju *Fusarium* i ich metabolitami wtórnymi, do których należą mikotoksyny fuzaryjne. Takiego kierunku działania oczekują też konsumenci, którzy poszukują żywności bezpiecznej, w tym coraz częściej pozyskiwanej metodami alternatywnymi.

Praca doktorska mgr inż. Izabeli Podgórskiej-Kryszczuk wpisuje się w nurt prac dotyczących biologicznej ochrony żywności przed grzybami z rodzaju *Fusarium* i ich negatywnymi skutkami. Podjęta tematyka badawcza jest niezwykle istotna dla bezpieczeństwa ludzi i produkowanej żywności. Dlatego wybór problematyki badawczej w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej uważam za uzasadniony, interesujący, mający charakter naukowy, innowacyjny i aplikacyjny.

Struktura pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 133 numerowanych stron i składa się z ośmiu rozdziałów: Wstęp, Przegląd literatury, Hipoteza badawcza i cel pracy, Materiał i metodyka badawcza, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Piśmiennictwo. Pracę poprzedzają Streszczenia w języku polskim i angielskim, Spis treści oraz Wykaz stosowanych skrótów i symboli, a kończą Wykaz tabel, wykresów, rysunków i fotografii. W pracy zamieszczono 23 tabele, 7 wykresów, 4 rysunki i 11 fotografii. Wykaz piśmiennictwa zawiera 279 pozycji bibliograficznych.

Stronę formalną pracy doktorskiej oceniam jako poprawną. Układ pracy jest prawidłowy, typowy dla prac o charakterze doświadczalnym.

Uwagi redakcyjne i edytorskie

Praca doktorska została przygotowana bardzo starannie. Błędy językowe są nieliczne. Stwierdzono różnice w pisowni nazwisk autorów cytowanych prac w zestawieniu z wykazem piśmiennictwa na str. 16 – Rodriguez i Nachrer, na str. 17 i 18 – Dall’ Asta i wsp., na str. 39 – Nout i wsp., na str. 95 – Martyniuk i Okoń, na str. 96 – Hajlaoui i Belanger, na str. 102 – Pettersson i wsp.

Występują też różnice w datowaniu prac cytowanych w treści dysertacji i w wykazie bibliograficznym. Dotyczy to np. cytowania na str. 99 – Słowik 2004, a w spisie piśmiennictwa jest Słowik 2006. W wykazie piśmiennictwa brakuje prac, które były cytowane w treści rozprawy doktorskiej. Dotyczy to m.in. Rozporządzenia Komisji UE 1881/2006 oraz Zalecenia Komisji UE 583/2006 oraz pracy Buzzini i wsp. z roku 2003 na którą powołuje się Autorka pracy doktorskiej na str. 98.

W wykazie piśmiennictwa zamieszczono publikacje, które nie zostały przywołane w treści rozprawy doktorskiej. Takie uchybienie stwierdzono wobec poz. 15, 34, 48, 202, 264 wykazu.

W wykazie bibliografii pomiędzy pracami autorów, których nazwiska zaczynały się na literę L, została zamieszczona praca autora na literę Ł.

Ocena merytoryczna pracy

W krótkim wstępie Autorka określa bardzo ogólnie zagadnienie bezpieczeństwa żywności kładąc nacisk na zagrożenia mikrobiologiczne, skupiając uwagę na zanieczyszczeniu żywności, głównie produktów rolnych, grzybami strzępkowymi z rodzaju *Fusarium* i ich patogeniczności i toksyczności. Biorąc powyższe pod uwagę Doktorantka wyznacza zasadniczy cel pracy, którym było: „...zastosowanie odpowiednio wyselekcjonowanych szczepów drożdży do ograniczenia występowania w żywności wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz wytwarzanych przez nie mikotoksyn”.

Kolejny rozdział zatytułowany „Przegląd literatury” stanowi teoretyczną część dysertacji. Autorka dokonuje bardzo pogłębionej charakterystyki grzybów z rodzaju *Fusarium*, poświęcając dużo miejsca ich występowaniu, omówieniu toksyczności produkowanych przez nie mikotoksyn. Omówiono wpływ grzybów z rodzaju *Fusarium* na zdrowie ludzi i zwierząt.

Patogeniczne grzyby, w tym także grzyby z rodzaju *Fusarium*, powodują duże straty w rolnictwie wpływając na wielkość zbiorów, jakość produkowanych pasz dla zwierząt oraz żywności. Efektem końcowym są wielowymiarowe skutki ekonomiczne. Najwięcej strat notuje się w uprawach zbóż oraz żywności i paszach z nich otrzymywanych. Doktorantka przedstawia powiadomienia w Raportach RASFF o występowaniu mikotoksyn, jednak w rozprawie nie pogłębia tematu strat wywołanych obecnością grzybów i ich toksyn w uprawach, szczególnie zbóż. Pomimo, że podrozdział zatytułowany jest „Ekonomiczne skutki występowania grzybów z rodzaju *Fusarium* i ich mikotoksyn w żywności”, to nie znajdujemy w nim żadnych danych dotyczących szacowania strat. Autorka nie zamieszcza też danych o geograficznym występowaniu patogenicznych grzybów. Z najnowszych badań wynika, że zmiany klimatyczne również mogą wpływać na rozprzestrzenianie się patogenicznych grzybów.

W dalszej części rozprawy doktorskiej Autorka omawia metody zapobiegania występowaniu grzybów z rodzaju *Fusarium*. Metody ograniczania rozprzestrzeniania się grzybów i ich toksyn są bardzo zróżnicowane. Można stosować zasady Dobrej Praktyki Rolniczej przed i po zbiorze plonów, prowadzić chemiczną ochronę, aż po metody biologiczne. Wiadomo, że rozwój tych patogennych organizmów zależy od aktywności wody a_w , temperatury, wartości odczynu środowiska pH , dostępności tlenu (O_2) i ditlenku węgla (CO_2), co ma duże znaczenie w przechowywaniu ziarna zbóż i ich produktów.

Ponieważ tradycyjne metody w sposób dalece niewystarczający chronią surowce, środowisko, żywność i pasze zwrócono uwagę na metody biologiczne z wykorzystaniem organizmów działających antagonistycznie lub konkurujących o rozwój. Autorka słusznie zauważyła, że działania prawne w postaci Rozporządzenia Komisji UE 1881/2006 z dnia 20.12. 2006 r. z późniejszymi zmianami, które określiło dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych, oraz Zalecenia Komisji UE 583/2006 w sprawie zapobiegania występowaniu i ograniczania występowania toksyn *Fusarium* w zbożach i produktach zbożowych wprowadziły określone standardy w praktyce rolniczej. Kolejne działania w tej sprawie wniosła Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów nałożyła od 1 stycznia 2014 r. na terenie UE obowiązek stosowania integrowanej ochrony roślin.

Najwięcej miejsca w tej części rozprawy doktorskiej Autorka poświęca mikroorganizmom działającym antagonistycznie oraz konkurującym o składniki odżywcze w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium*.

Dokonano charakterystyki mikroorganizmów posiadających zdolności usuwania mikotoksyn fuzaryjnych, przy czym największą uwagę skupiono na antagonistycznym działaniu drożdży, co jest zrozumiałe biorąc pod uwagę cel i zakres pracy.

Wartością dodaną w tej części rozprawy są dobrze udokumentowane zestawienia tabelaryczne (tabele 1 – 5) i wykres nr 1. Niestety poza tabelą 1 i 2 w pozostałych tabelach i wykresie brak informacji co do źródła ich pochodzenia. Czy są to opracowania własne, czy też zostały zaczerpnięte z prac innych autorów?

Oceniając teoretyczną część pracy pragnę podkreślić, że została ona przygotowana na podstawie dobrze dobranej i właściwie cytowanej literatury, w większości w języku angielskim. Na 279 pozycji piśmiennictwa aż 239 to publikacje obcojęzyczne. W wykazie literatury 270 pozycji stanowi piśmiennictwo z lat 2000 – 2019. Zaledwie 17 pozycji to literatura z ubiegłego wieku.

W rozdziale 3 dysertacji Autorka stawia hipotezę badawczą i określa cel pracy oraz cele szczegółowe, które w istocie stanowią zakres pracy. Hipoteza badawcza jest w mojej opinii oczywista, biorąc pod uwagę wnioski wyciągnięte z teoretycznej części pracy. Natomiast szkoda, że Autorka nie postawiła kolejnej hipotezy, która odnosiłaby się do różnic w mechanizmach działania pomiędzy drożdżami izolowanymi ze zbóż pochodzących z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej.

Nasuwa się tutaj uwaga w kontekście teoretycznej części pracy, postawionej hipotezy badawczej, celu pracy i celów szczegółowych do tytułu rozprawy doktorskiej, który ma postać: „Drożdże jako czynnik ograniczenia grzybów z rodzaju *Fusarium* w żywności”. Czy tytuł rozprawy nie powinien brzmieć: „Drożdże jako czynnik ograniczenia grzybów z rodzaju *Fusarium* w wybranych zbożach i produktach zbożowych”? W mojej opinii zaproponowany tytuł rozprawy doktorskiej jest bardzo ogólny.

Szczególne uznanie budzi doskonała prezentacja materiału i metodyki badawczej. Na ponad 20 stronach Autorka z niezwykłą precyzją przedstawia wszystkie odczynniki i podłoża zastosowane w badaniach, przygotowanie szkła laboratoryjnego oraz opis metod analitycznych.

W badaniach wykorzystano kultury drożdży pochodzące z kolekcji kultur Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz kultury drożdży izolowane z trzech gatunków zbóż: pszenicy, jęczmienia i owsa. Dokonano charakterystyki drożdży wyizolowanych ze zbóż, przeprowadzono identyfikację genetyczną za pomocą bardzo dobrze przedstawionej metodyki izolowania DNA z komórek drożdży.

Kolejnym etapem w badaniu właściwości izolowanych drożdży była identyfikacja związków lotnych z zastosowaniem techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (HS-SPME) z próbkowaniem znad hodowli badanych drożdży z grzybami *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* i *F. poae*.

W dalszej części badania oznaczono aktywność lityczną enzymów drożdży chitynazy i β -1,3-glukanazy wobec izolatów ścian komórkowych grzybów. Badania te poprzedziło badanie aktywności enzymów chitynazy i β -1,3-glukanazy.

Wszystkie te analizy stanowiły przygotowanie do określenia hamowania wzrostu grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz produkcji mikotoksyn w ziarnie pszenicy. Wyizolowane drożdże aktywnie konkurowały o składniki odżywcze np. żelazo z grzybami z rodzaju *Fusarium*.

Wyniki badań zostały opracowane statystycznie z wykorzystaniem programu Statistica i Excel. Przeprowadzono analizę wariancji ANOVA wyników badań po wcześniejszym określeniu istotności różnic pomiędzy średnimi grupowymi testem Tukeya. Wyniki zostały poprawnie zinterpretowane przez Autorkę. Mam jednak do Autorki pytanie dlaczego Tabela 19 nie zawiera wyników analizy wariancji? Ta uwaga dotyczy także kolejnych tabel zawierających prezentację uśrednionych wyników.

Na szczególne podkreślenie zasługuje graficzna dokumentacja pracy w postaci wykresów i fotografii, co jest kolejną wartością dodaną tej rozprawy doktorskiej. Za wyjątkowo cenne z punktu widzenia zapewnienia bezpieczeństwa stosowania izolatów drożdży uważam badania nad możliwością powstawania amin biogennych. W dalszych badaniach powinny być wykorzystywane te izolaty drożdży, które nie wytwarzają amin biogennych.

Badania przeprowadzone w tej pracy nad wpływem drożdży wyizolowanych ze zbóż pszenicy, jęczmienia i owsa na wzrost grzybów z rodzaju *Fusarium* i produkcję mikotoksyn mają charakter modelowy. Szkoda, że Autorka nie zaprezentowała modelu tych badań lecz podeszła do zagadnienia w sposób fragmentacyjny prezentując kolejne etapy postępowania.

Praktycznym aspektem przeprowadzonych badań było zastosowanie wyselekcjonowanych drożdży w mące przeznaczonej do wypieku chleba. Przygotowano ciasto chlebowe z mąki zawierającej mikotoksyny wytworzone przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. W pieczywie z dodatkiem izolatów drożdży wykazano znaczącą redukcję mikotoksyn. Otrzymane wyniki stanowią zachętę do kontynuacji badań nad wykorzystaniem drożdży w walce z grzybami z rodzaju *Fusarium* i ograniczaniem wytwarzanymi przez nie mikotoksynami.

Na wysokim poziomie naukowym przeprowadzono dyskusję uzyskanych wyników badań. Doktorantka umiejętnie konfrontowała wyniki swoich badań z wynikami innych autorów. W końcowej części dyskusji Doktorantka stwierdza, że „...uzyskane wyniki badań wskazują na możliwość praktycznego zastosowania wyselekcjonowanych w niniejszej pracy izolatów drożdży, zarówno jako czynników biologicznego ograniczania grzybów z rodzaju *Fusarium* w ochronie zbóż, jak też jako składniki nowych kultur starterowych w piekarnictwie o ukierunkowanym działaniu polegającym na obniżeniu zawartości mikotoksyn fuzaryjnych”. W związku z tym stwierdzeniem mam pytanie do Doktorantki jak wyobraża sobie praktyczne zastosowanie w warunkach produkcyjnych takich izolatów drożdży? Czy te praktyki miałyby mieć charakter profilaktyczny? W obecnej chwili mamy normy określające dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń mąki mikotoksynami grzybowymi. Zapewnienie bezpieczeństwa konsumentom żywności przed mikotoksynami wytwarzanymi przez grzyby *Fusarium* wyraża też Wspólnota Europejska, która w Rozporządzeniu 1881 z dnia 19 grudnia 2006 r. określiła tolerowane dzienne pobranie (TDI) dla deoksyniwalenolu, zearalenonu, niwalenolu, fumonizyn B₁, B₂, B₃ oraz toksyn T-2 i HT-2. Uregulowaniom prawnym podlega kilkanaście mikotoksyn w żywności i w paszach. Niepokój budzi natomiast brak regulacji prawnych dla modyfikowanych mikotoksyn, w tym szczególnie modyfikowanych form deoksyniwalenolu.

W ostatnim akapicie kończącym dyskusję wyników znajdujemy informację o możliwości praktycznego zastosowania drożdży do ograniczenia wzrostu grzybów *Fusarium* oraz ograniczania mikotoksyn fuzaryjnych w zbożu i pieczywie. Niestety brakuje stwierdzenia czy Doktorantka pozytywnie czy też negatywnie zweryfikowała postawioną hipotezę. Cytaty z rozprawy doktorskiej wskazują na pozytywną weryfikację hipotezy.

Rozprawę doktorską kończy 10 wniosków. Sformułowane wnioski są odpowiedzią na zakresione w pracy cel główny i cele szczegółowe. Zdecydowanie więcej drożdży wyizolowano ze zbóż uprawianych w systemie ekologicznym niż w konwencjonalnym, co może być dobrym prognostykiem dla dalszego rozwoju rolnictwa ekologicznego. Bardzo cennym okazał się wniosek, iż izolat drożdży *Cryptococcus carnescens*, który ograniczał wzrost grzybni wszystkich trzech badanych grzybów *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* oraz *F. poae* lecz z powodu wytwarzania amin biogennych nie powinien być stosowany w technologii żywności.

Wniosek końcowy

Reasumując, rozprawa mgr inż. Izabeli Podgórskiej-Kryszczuk pt.: „Drożdże jako czynnik ograniczania grzybów z rodzaju *Fusarium* w żywności” wykonana pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. Ewy Solarskiej oraz promotora pomocniczego dr hab. Moniki Kordowskiej-Wiater jest pracą na wysokim poziomie naukowym oraz posiada walory poznawcze i aplikacyjne.

Rozprawa doktorska „Drożdże jako czynnik ograniczania grzybów z rodzaju *Fusarium* w żywności” jest jedną z niewielu prac, która w tak szerokim zakresie dotyczy możliwości zastosowania drożdży wyizolowanych z wybranych zbóż w ograniczaniu rozwoju grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz mikotoksyn fuzaryjnych w zbożu i pieczywie.

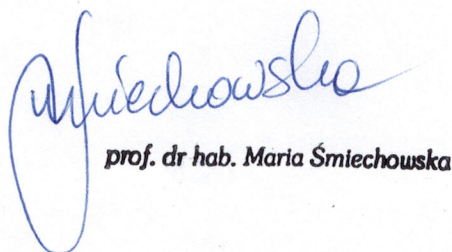
Jednocześnie pragnę zaznaczyć, że uwagi i zapytania zawarte w recenzji stanowią w większości uchybienia edytorskie i nie odnoszą się do merytorycznej wartości pracy.

Praca doktorska mgr inż. Izabeli Podgórskiej-Kryszczuk spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn.: Dz.U. z 2017 r. poz. 1789).

Wnioskuje więc do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Izabeli Podgórskiej-Kryszczuk do dalszych etapów postępowania w procedurze o nadanie stopnia doktora.

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej

Jednocześnie zwracam się do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Izabeli Podgórskiej-Kryszczuk. Uważam, że poziom merytoryczny pracy, imponujący zakres wykonanych badań laboratoryjnych, doskonała dokumentacja uzyskanych wyników oraz wysoki poziom naukowej dyskusji zasługuje na wyróżnienie.



prof. dr hab. Maria Śmiechowska