



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wojska Polskiego 48

60-627 Poznań

tel. +48 61 848 73 54

e-mail: kbimz@up.poznan.pl

WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOSCI I ŻYWIENIU
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Poznań, 05.07.2022

Prof. dr hab. Katarzyna Czaczyk
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-637 Poznań

RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Skotniczny
pt. „Bioróżnorodność bakterii kwasu mlekowego izolowanych z tradycyjnych
produktów fermentowanych oraz ocena wybranych cech technologicznych”**

wykonanej w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Wydziału Technologii Żywności

Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie

pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Pawła Satory

Opracowanie niniejszej recenzji jest uzasadnione uchwałą Rady dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie o powołaniu mnie na Recenzenta rozprawy mgr inż. Magdaleny Skotniczny pt. „Bioróżnorodność bakterii kwasu mlekowego izolowanych z tradycyjnych produktów fermentowanych oraz ocena wybranych cech technologicznych”.

Bakterie fermentacji mlekowej (ang. Lactic Acid Bacteria - LAB), pomimo licznych badań prowadzonych z ich udziałem i wielu tysiącom publikacji naukowych im poświęconych, nadal cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem naukowców na całym świecie. Szczególnie dużym zainteresowaniem cieszą się szczepy izolowane z tradycyjnie fermentowanych produktów regionalnych. Prawie każdy kraj, czy też każdy region geograficzny, posiada specyficzne produkty powstające z udziałem tej grupy bakterii. Bardzo często są one składnikiem diety mieszkańców od wieków. W Polsce do najbardziej znanych tradycyjnych produktów powstających z udziałem LAB należą kiszona kapusta czy ogórki, a także sery wytwarzane na Podhalu (m.in. Bryndza Podhalańska). Szczepy izolowane z takich produktów mogą mieć nowe, pożądane cechy funkcjonalne i mogą być lepiej przystosowane do środowiska fermentacyjnego. Jednakże zastosowanie nowo wyizolowanych szczepów w

praktyce przemysłowej wymaga ich identyfikacji i dokładnej charakterystyki. Biorąc pod uwagę wszystkie te aspekty, uważam, że podjęta przez Doktorantkę tematyka badań jest bardzo aktualna i ciekawa, w szczególności pod względem aplikacyjnym i przyczynia się do lepszego poznania polskich tradycyjnych produktów fermentowanych jakimi są kapusta kiszona i Bryndza Podhalańska.

Ocena formalnej strony pracy

Praca doktorska mgr inż. Magdaleny Skotniczny jest opracowaniem obejmującym 157 stron maszynopisu, w tym 29 tabel i 35 rysunków. Struktura pracy jest właściwa dla rozpraw o charakterze eksperymentalnym. Jednakże pewne zastrzeżenia formalne budzą rozdziały 4-6 (Rozdz. 4 Materiały, Rozdz. 5 Przebieg prowadzonych analiz, Rozdz. 6 Metodyka), które powinny być ujęte w jednym rozdziale pt. Materiały i metody. Przebieg prowadzonych analiz jest także metodyką badań. Zastanawiające jest także umieszczenie streszczenia i abstractu pomiędzy rozdziałem Wnioski a Spisem tabel i rysunków oraz Bibliografią. Zazwyczaj streszczenie umieszcza się na początku lub na końcu pracy. Nie jest ono także ujęte w spisie treści. W pracy zacytowano 188 pozycji światowej literatury, ściśle związanej z tematyką przedstawionego opracowania. Zdecydowana większość to literatura angielskojęzyczna obejmująca najnowsze badania związane z LAB, w szczególności tymi izolowanymi z fermentowanych produktów regionalnych. Tezy badawcze, cel pracy i jej zakres są jasno i precyzyjnie określone.

Ocena merytoryczna pracy

W rozdziale poświęconym przeglądowi literatury, Autorka przedstawiła ogólną charakterystykę i klasyfikację LAB oraz ich wybrane właściwości technologiczne. Przedstawiła także metody typowania i identyfikacji LAB wykorzystanych w pracy oraz podała krótki opis tradycyjnych produktów fermentowanych: kapusty kiszonej i Bryndzy Podhalańskiej. Szczególnie ciekawe informacje zostały zawarte w rozdziale 2.2. Elastyczność metaboliczna jako strategia adaptacyjna LAB. Zastrzeżenia Recenzenta budzą jednak niektóre tytuły rozdziałów: np. Rozdział 2.3.1. Profil wytwarzanych kwasów organicznych, jest w rzeczywistości poświęcony działaniu tych kwasów, nie ma natomiast informacji dotyczącej zakresów syntezy tych związków w zależności od np. szczepu, czy warunków hodowli. Rozdział 2.3.2. Właściwości antymikrobiologiczne, jest w zasadzie całkowicie poświęcony bakteriocynom wytwarzanym przez LAB, brak jest omówienia pozostałych związków wytwarzanych przez te bakterie, które również takie właściwości posiadają. Nie mniej jednak

uważam, że przedstawione opracowanie literaturowe jest dobrym wprowadzeniem do części eksperymentalnej pracy.

W rozdziałach 4-6, Materiały, Przebieg prowadzonych analiz i Metodyka Pani Magdalena Skotniczny przedstawiła zastosowane w pracy materiały i metody badań. Doktorantka wykorzystała techniki i metody adekwatne do potrzeb wynikających z celu niniejszej pracy. Rozdział ten został przygotowany starannie, a wszystkie doświadczenia poprawnie opisane. W trakcie czytania tego rozdziału Recenzentowi nasunęły się pewne pytania i uwagi:

- Rozdział 5.1.2. Analiza ilościowa LAB. Do oznaczenia liczby komórek LAB w kiszzonej kapuście zastosowano inkubację w temperaturze 20°C, a wyniki odczytywano po 48h. Czy zdaniem Autorki nie jest to zbyt krótki czas inkubacji przy obniżonej temperaturze do obliczenia rzeczywistej liczby komórek LAB w tym produkcie? Tym bardziej, że prowadząc inkubację LAB, w optymalnej dla nich temperaturze 30°C, odczytuje się wyniki nawet po 72h. Dlaczego w celu izolacji i zabezpieczania wyizolowanych kultur LAB zastosowano już temperaturę 34°C?
- Rozdział 6.10, 6.11. Jakie oprogramowanie do obróbki chromatogramów zostało wykorzystane do oznaczeń ilościowych cukrów i kwasów organicznych?
- Rozdział 6.12. Analiza związków lotnych. W metodyce badań nie powinny być cytowane tabele z rozdziału Wyniki i dyskusja.
- W Rozdziale 6.13. Analiza statystyczna, na stronie 48, pojawia się skrót OTU, który zostaje wyjaśniony dopiero na stronie 63. Nie ma go też w wykazie stosowanych skrótów.

Pierwszy rozdział Wyników i dyskusji poświęcony został analizie mikrobiologicznej kapusty kiszzonej obejmującej oznaczenie liczebności LAB w poszczególnych dniach fermentacji różnych odmian kapusty oraz izolacji szczepów. W celu wytypowania tożsamyh izolatów oraz oceny ich bioróżnorodności przeprowadzono analizę PCR z wykorzystaniem losowej amplifikacji polimorficznego DNA. Identyfikacji szczepów dokonano na podstawie sekwencjonowania genu 16S rRNA oraz specyficznej amplifikacji genu *mutL* charakterystycznej dla *Lactiplantibacillus plantarum*. Do badania mikrobioty kapust w 14 dniu fermentacji wykorzystano także sekwencjonowanie NGS regionów hiperprzemienionych V3-V4 genów 16S rRNA. Na podstawie analizy uzyskanych wyników dokonano oceny zróżnicowania mikrobioty bakteryjnej kiszzonej kapusty, w zależności od odmiany. Zidentyfikowane bakterie należały do 4 gatunków, przy czym dominujący był

Lactiplantibacillus plantarum (31 szczepów). Wykryto natomiast obecność tylko 2 szczepów należących do gatunku *Leuconostoc mesenteroides*. Autorka słusznie uważa, że niewykrycie w tym produkcie pewnych szczepów LAB mogło być związane z subiektywnym wyborem kolonii lub przewagą środowiskową szczepów należących do byłego rodzaju *Lactobacillus*. Zdaniem Recenzenta może to być także spowodowane wolniejszym wzrostem niektórych szczepów LAB podczas inkubacji w temp. 20°C i brakiem izolacji takich kolonii. Mogą to być mikroorganizmy, które pojawiają się w procesie kiszenia kapusty, na późniejszych etapach tego procesu.

Analogiczne badania wykonano także dla Bryndzy Podhalańskiej. W tym przypadku uzyskano dużą bioróżnorodność izolatów i zidentyfikowano szczepy należące do 10 gatunków bakterii, przy czym dominującymi były *Lactococcus lactis*, *Lacticaseibacillus paracasei* i *Lactiplantibacillus plantarum*. Na podstawie analizy uzyskanych wyników nie wykazano związku składem mikrobioty poszczególnych serów, a zawartością mleka owczego, regionem czy okresem jego produkcji. Zastanawiające jest jednak dlaczego tak mało izolatów pochodziło z serów wyprodukowanych we wrześniu 2016 r. Wykrycie w badanym materiale bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* czy klasy *Gammaproteobacteria*, związanych z człowiekiem oraz bakterii związanych ze środowiskiem gleby i roślin, jest potwierdzeniem braku odpowiednich warunków higienicznych podczas wytwarzania Bryndzy Podhalańskiej. Uzyskane na tym etapie pracy wyniki pokrywają się z badaniami innych Autorów. Przeprowadzona analiza głównych składowych pozwoliła częściowo wyjaśnić przyczyny zmienności mikrobioty serów w zależności od miejsca ich wytwarzania.

Kolejny etap pracy obejmował ocenę wybranych właściwości technologicznych wybranych 10 szczepów LAB (5 izolowanych z kapusty kiszzonej i 5 izolowanych z Bryndzy Podhalańskiej). Wybranymi izolatami zaszczepiano pasteryzowany sok z kapusty głowiastej białej oraz pasteryzowane mleko. Pomimo kilku przeprowadzonych prób nie udało się doprowadzić do koagulacji mleka. Autorka sugeruje, że wiele szczepów LAB, zwłaszcza pałeczek kwasu mlekowego, nie jest zdolna rozwijać się w mleku ze względu na niedobór niebiałkowych związków azotowych (str. 98). Ich rozwój byłby prawdopodobnie możliwy dzięki obecności innych mikroorganizmów, które m.in. tworzyłyby niezbędne egzogenne substancje odżywcze. O jakie „niebiałkowe związki azotowe” chodzi i które z bakterii LAB są zdolne do syntezy takich związków? Z uwagi na nieudane próby fermentacji mleka zaniechano oznaczania właściwości technologicznych monokultur z wykorzystaniem tego modelu i zdefiniowano je tylko na podstawie przeprowadzonej z ich udziałem, fermentacji soku z

kapusty głowiastej białej. Zabrakło tutaj próby wyjaśnienia zjawiska braku koagulacji mleka, chociażby na podstawie oznaczeń kwasowości, zawartości kwasu mlekowego i octowego, a w szczególności kinetyki wytwarzania tych kwasów. Być może pozwoliłoby to na chociaż częściowe wyjaśnienie tego zjawiska.

Badania właściwości technologicznych 10 izolatów LAB fermentujących sok z kapusty, obejmowały szeroki zakres analizowanych grup związków chemicznych. Oprócz określenia zawartości kwasów organicznych i ilości zużytych cukrów, oznaczano także średnie ilości estrów, laktonów, związków karbonylowych, alkoholi, fenoli, kwasów tłuszczowych, terpenów i ich pochodnych, związków siarkoorganicznych oraz nitryli. Ta kompleksowa analiza związków lotnych, które mogą być wytwarzane przez izolowane szczepy LAB zasługuje na szczególne uznanie. LAB podczas fermentacji wytwarzają lub metabolizują związki lotne, co będzie wpływać na profil sensoryczny gotowego produktu, a więc jego jakość oraz akceptowalność konsumencką. W tej części pracy znalazły się także ciekawe elementy dyskusji dotyczące omówienia potencjalnej roli poszczególnych związków lotnych w procesie fermentacji mlekowej oraz porównanie uzyskanych rezultatów z wynikami innych Autorów.

W pracy rozdział Wyniki połączony jest z dyskusją, a praca kończy się krótkim podsumowaniem i 6 wnioskami, które znajdują pełne uzasadnienie w wynikach prac eksperymentalnych.

Przedłożoną mi do recenzji pracę dysercyjną przeczytałam z dużym zainteresowaniem i oceniam ją wysoko. W trakcie czytania pracy pojawiły się jednak pewne pytania i uwagi:

- na str. 17 Autorka pisze „Kwasy organiczne produkowane przez LAB są stosowane w przemyśle spożywczym zarówno w formie oczyszczonej...” Które kwasy organiczne wytwarzane przez LAB, oprócz kwasu mlekowego, są stosowane w formie oczyszczonej w przemyśle spożywczym?
- brak konsekwencji w używaniu skrótu LAB, raz używany jest skrót LAB, raz pełna nazwa bakterie fermentacji mlekowej
- dlaczego mannitol znalazł się w tabeli 22 zatytułowanej „Średnie ilości cukrów...”
- używanie raz pełnych nazw rodzajowych, raz skrótów postaci jednej litery, może wprowadzić czytelnika w błąd, np. *L. lactis* –nie wiadomo czy chodzi o *Leuconostoc lactis* czy *Lactococcus lactis* (str. 84)
- W rozdziale dotyczącym kapusty kiszzonej (rozd. 2.5.1.) zawarte są informacje dotyczące dodatku soli, który stosuje się w tym procesie – 1,5 – 2,0 % w/w. Dlaczego

podczas eksperymentów przeprowadzonych w ramach tej pracy zastosowano dodatek soli na poziomie 2,5% w/w, a np. w badaniach przeprowadzonych przez Tlais i in. [2023] tylko 1,3%? Z czego wynikają te różnice?

Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską mgr inż. Magdaleny Skotniczny oceniam pozytywnie. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny monografia jest oryginalnym i znaczącym wkładem naukowym do działu wiedzy dotyczącej bakterii fermentacji mlekowej, w szczególności tych pochodzących z polskich produktów regionalnych. Jest to poprawnie zaplanowane i dobrze zrealizowane studium naukowe. Świadczy to o dojrzałości naukowej Autorki oraz Jej dobrym przygotowaniu zarówno merytorycznym, jak i warsztatowym. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca w pełni odpowiada wymaganiom ustawowym (ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki - Dz.U. z 2016 r. poz. 882 ze zm.). W związku z tym wnoszę o jej przyjęcie przez Radę dyscypliny technologia żywności i żywienia, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie oraz o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

K. Czaczyk

Katarzyna Czaczyk