

Lublin, 05.11.2018

dr hab. Michał Świeca prof. UP  
Katedra Biochemii i Chemii Żywności  
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Łukasz Wajda

pt. „Identyfikacja grzybów dominujących w jabłkach oraz możliwości zahamowania ich wzrostu w napojach jabłkowych poprzez dodatek *Arthrospira platensis*”  
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Dudy-Chodak

Podstawa prawna: Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65 poz.595 z późn. zm.)

Podstawą opinii jest pismo dr hab. Agnieszki Filipiak-Florkiewicz prof. nadzw. UR Dziekana Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie z dnia 23-10-2018

#### **Informacje ogólne - uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej**

Polska jest jednym z głównych producentów owoców w Europie i na świecie. Według szacunków Głównego Urzędu Statycznego w roku 2018 zbiory z sadów jabłoniowych wyniosą 3,7 mln ton, co stanowi wzrost o około 25% w stosunku do produkcji z lat 2011-2015. Wielkość produkcji oraz udział tego surowca w przemyśle spożywczym nakłada na otoczenie naukowe szczególny obowiązek polegający na monitorowaniu zagrożeń związanych z uprawą jabłoni, późniejszym przetwarzaniem owoców oraz przechowywaniem już gotowych produktów. Zadania te obejmują między innymi ocenę zagrożeń biologicznych

będących źródłem pierwotnych i wtórnych zanieczyszczeń mikrobiologicznych oraz opracowanie nowych technologii pozwalających na zachowanie lub polepszanie jakości konsumenckiej produktów.

Pomimo faktu, że dotychczasowe metody identyfikacji mikroorganizmów bytujących na jabłkach i odpowiedzialnych za ich psucie, a tym samym bezpieczeństwo spożycia, są dobrze opracowane, pojawia się potrzeba właściwej identyfikacji gatunków potencjalnie niebezpiecznych. Tradycyjne metody posiewowe oraz testy biochemiczne w wielu przypadkach nie pozwalają na jednoznaczną identyfikację, co jest niezwykle istotne w przypadku szczepów zdolnych do produkcji toksyn. W świetle powyższego próba podjęta przez Doktoranta mająca na celu identyfikację mykobioty jabłek przy użyciu technik molekularnych staje się niezwykle istotna. Poznanie gatunków, które naturalnie dominują w surowcu pozwala na opracowanie nowych strategii mających na celu ograniczenie ich niekorzystnego wpływu na jakość konsumencką produktów.

Na jakość konsumencką soków owocowych wpływa wiele czynników min. jakość surowca wyjściowego, technologia produkcji, metody zabezpieczania czystości mikrobiologicznej, dodatek substancji stabilizujących. Czystość mikrobiologiczna jest zwykle zapewniana poprzez sterylizację termiczną uzyskanych soków, jednak należy pamiętać, że metoda ta prowadzi do istotnych zmian w składzie finalnego produktu, w szczególności prowadzi do degradacji substancji o potencjalnym działaniu prozdrowotnym. Aby sprostać wzrastającym wymaganiom konsumentów coraz częściej do obrotu wprowadza się soki niepasteryzowane, które charakteryzuje jednak krótki okres przydatności do spożycia oraz ściśle zdeterminowane warunki transportu i przechowywania. W celu zapewnienia właściwej jakości żywności niskoprzetworzonej, w tym soków niepasteryzowanych podejmuje się w ostatnich latach wiele badań, które często oceniają możliwość zastosowania dodatków funkcjonalnych. W trend ten wpisuje się zastosowanie biomasy sinic *Arthrospira platensis* w celu kreowania jakości mikrobiologicznej soków jabłkowych, a w szczególności ograniczania wzrostu grzybów z rodzaju *Aureobasidium*.

Z uwagi na powyższe tematyka podjęta w dysertacji doktorskiej Pana mgr inż. Łukasza Wajdy jest niezwykle istotna, a uzyskane wyniki wnoszą znaczący wkład do nowoczesnej technologii żywności.

## **Ocena formalna pracy**

Podstawę rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Łukasza Wajdy pt. „Identyfikacja grzybów dominujących w jabłkach oraz możliwości zahamowania ich wzrostu w napojach jabłkowych poprzez dodatek *Arthrospira platensis*”, stanowi 195 stronicowe opracowanie monograficzne. Jest to praca eksperymentalna, w której zamieszczono 18 tabeli oraz 25 opracowań o charakterze wykresów i rysunków. Zasadnicza część pracy obejmuje 186 stron, zaś resztę stanowi aneks obejmujący przykłady analiz w programach GelAnalyzer i BioEdit. Dysertacja składa się z 7 głównych rozdziałów poprzedzonych Spisem treści, Spisem stosowanych skrótów oraz Wstępem. Praca kończy się podsumowaniem w języku polskim i angielskim oraz spisem literatury obejmującym 359 pozycji. Autor podzielił badania na 4 główne części, znajduje to odzwierciedlenie w rozdziałach Materiały i metody oraz Wyniki i dyskusja. Podział ten w logiczny i konsekwentny sposób prowadzi do realizacji celów i weryfikacji postawionych hipotez. Pewną niedogodność stanowi sposób przedstawiania wyników – sugeruję najpierw prezentować wyniki (tabele, wykresy), a następnie dokonywać ich opisu, oceny i dyskusji.

## **Ocena merytoryczna pracy**

W przeglądzie literatury Autor dokonuje szczegółowej i w mojej ocenie kompleksowej charakterystyki patogenów i drobnoustrojów występujących w owocach, sokach, nektarach i napojach. Szczególny nacisk położony został na patogenny grzybowe oraz metody ich właściwej identyfikacji w materiale. W oparciu o opis można wnioskować, że jego wiedza dotycząca technik stosowanych do tego typu analiz jest wysoka i kompleksowa. Jakkolwiek zagadnienia te zostały opracowane szczegółowo, pewien niedosyt budzi pobieżne potraktowanie zagadnień związanych z technologią produkcji soków owocowych, jak też metodami mającymi na celu zapewnienie właściwej jakości mikrobiologicznej. Pragnę również zwrócić uwagę na zbyt krytyczne, w mojej opinii, odniesienie się do dotychczasowych badań prowadzonych w celu identyfikacji patogenów w żywności – str. 22. W mojej opinii opisy technik/metod stosowanych do identyfikacji drobnoustrojów są bardzo uproszczone i mogłyby zostać pominięte. Kontrowersyjnym wydaje się także, stwierdzenie (str. 36), że ograniczenie stresu oksydacyjnego w komórkach neuroblastomy jest efektem pożądanym. Odnosząc się do informacji zawartych w tym rozdziale, chciałbym zapytać jaką

metodologię zaproponowałby Doktorant w celu kompleksowej i prawidłowej oceny mykobioty w jabłkach.

Sformułowane hipotezy badawcze i cele pracy oraz sposoby ich realizacji zostały jasno określone. Autor w pierwszych etapach badań pragnie zidentyfikować grzyby dominujące w trzech odmianach jabłek o różnym pochodzeniu, zaś następnie podejmuje próbę oceny możliwości zahamowania wzrostu *Aureobasidium pullulans* w napoju jabłkowym przez dodatek suszonej biomasy *Arthrospira platensis*.

Rozdział Materiały i metody w sposób szczegółowy i kompleksowy charakteryzuje surowce, metodologię badań mikrobiologicznych, technologię produkcji napojów jabłkowych oraz ocenę antygrzybowego działania suszonej biomasy sinic. W tej części dysertacji pewne stwierdzenia wymagają uściślenia lub wyjaśnienia:

-str. 46 „...rozcieńczenie inhibitorów PCR..”, nie jest do końca jasnym, co Autor rozumie przez to stwierdzenie,

-str. 52, sugerowałbym w opracowaniu używać zwrotu „suszona biomasa sinic” lub po prostu Spirulina. Zwrot „dodatek *Arthrospira platensis*” użyty w tytule podrozdziału jest niejednoznaczny.

-str. 53. Czy Autor przeprowadzał badania mające na celu zoptymalizowanie metody izolowania frakcji białkowej ze Spiruliny. Poziom wysycenia 25% wydaje się być bardzo małym. Czy po procesie wysalania z preparatu został usunięty nadsiarczan amonu?

-str. 54. Czy zaproponowana metodologia produkcji Spiruliny, oparta na użyciu etanolu, nie powodowała zmian ilościowo- jakościowych we frakcji polisacharydowej?

Jak już nadmieniono we wcześniejszej części recenzji, dysertacja została podzielona na 4 części. W pierwszych dwóch Pan mgr inż. Łukasz Wajda wykazał, że liczebność grzybów zasiedlających jabłka zależy nie tylko od badanej odmiany tych owoców, ale także od lokalizacji sadu i okresu wegetacyjnego. Większość izolatów grzybów pozyskanych z trzech odmian jabłek należała do gatunku *Aureobasidium pullulans*. Drożdże występują w jabłkach w mniejszości i należą głównie do rodzajów *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Pichia* oraz *Candida*. Wśród pleśni w jabłkach najczęściej obecne są gatunki należące do rodzaju *Penicillium*, ale występują także przedstawiciele rodzajów *Cladosporium*, *Alternaria* oraz *Fusarium*. Niezwykle istotnym wydaje się potwierdzenie w jabłkach obecności *Penicillium commune* oraz *P. polonicum*, które są drobnoustrojami kserofilnymi, produkującymi mykotoksyny. Wykazano również, że izolat *A. pullulans* LW57 jest wydajnym producentem egzopolisacharydów. Do wartościowych osiągnięć Doktoranta należy także zaliczyć wyniki

stwierdzające, że sekwencja genów kodujących 5.8S rRNA nie jest konserwatywna, w związku z powyższym jej analiza nie pozwala na skuteczną identyfikację blisko spokrewnionych szczepów grzybów.

Dwie ostatnie części dysertacji obejmowały swym zakresem ocenę możliwości zahamowania wzrostu *Aureobasidium pullulans* LW14 w pasteryzowanych i niepasteryzowanych napojach jabłkowych poprzez dodatek biomasy *Arthrospira platensis*. Wykazano, że analizowane szczepy *A. pullulans* nie stanowią zagrożenia w przypadku produktów z jabłek poddawanych obróbce termicznej, gdyż nie przeżywają one procesu pasteryzacji. Dodatek Spiruliny w stężeniu 1,15%, to jest stężeniu akceptowalnym przez konsumentów, hamował wzrost grzybów w trakcie chłodniczego przechowywania, natomiast dalsze zwiększanie dawki nie miało istotnego wpływu. Autor w swoim dziele wskazuje, że za mykostatyczne działanie Spiruliny wobec *A. pullulans* LW14 w układzie modelowym odpowiada frakcja białkowa, jednak w oparciu o wyniki zawarte w Tabeli 17 (napoje niepasteryzowane) można wnioskować, że składniki wykazują działanie synergistyczne. Niezwykle wartościowe wyniki dotyczą implementacji biomasy sinic do niepasteryzowanych napojów jabłkowych, gdzie wykazano, że Spirulina efektywnie ogranicza nie tylko wzrost grzybów, lecz także innych mikroorganizmów odpowiedzialnych za psucie się produktu.

Wyjaśnienia lub korekty wymagają następujące sformułowania:

-str. 127. Prosiłbym, aby Doktorant odniósł się do potencjalnej przeciwdrobnoustrojowej aktywności chlorofilu i kwasów tłuszczowych. Jednocześnie chciałbym zauważyć, że sposób przygotowania Spiruliny wyklucza obecność natywnych form enzymów, w tym także chitynazy.

Str. 128. Czy mógłby Pan odnieść się do różnic obserwowanych w zawartości badanych cukrów w czasie „0” doświadczenie pomiędzy wariantami doświadczenia (Tabela 15). Być może obserwowane efekty należałoby odnieść do stanu z początku doświadczenia i wyrazić jako procent zmiany.

W całej dysertacji Doktorant stara się rzetelnie interpretować uzyskane wyniki i konfrontować obserwacje z innymi badaniami z zakresu tematu. Pomimo wysokiej jakości badań czuję się w obowiązku zwrócić uwagę na pewne niedopowiedzenia, skróty myślowe oraz błędy stylistyczne i edytorskie, które pojawiły się w dysertacji np.: Tabela 1, Str. 22, Str. 27 – „...zajście barwnej reakcji metabolitów..”, str. 36 „...skutkom starzenia się skóry...”, Str. 61 – „przy użyciu HPLC”, str. 100 – „...szczegółowa analiza molekularna grzybów...” - w mojej ocenie zbyt szerokie określenie, str. 101 – „...zawiera ona więcej substancji odżywczych...” – uogólnianie, Str. 111, Tabela 1 – „wielkość prążka” – kolokwializm.

W rozdziale Podsumowania i wnioski Autor systematyzuje uzyskane obserwacje oraz przedstawia wnioski końcowe, które wskazują, że z sukcesem udało mu się zrealizować postawione cele. W odniesieniu do powyższego stwierdzam, że Kwalifikant umiejętnie połączył ze sobą zagadnienia z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej, bioinformatyki, chemii analitycznej oraz technologii żywności, a przedstawiona do oceny dysertacja zawiera wyniki wartościowe pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Jednocześnie pragnę podkreślić, że wszystkie uwagi przedstawione w ocenie pracy mają charakter redakcyjny, część z nich dyskusyjny i nie mają one wpływu na pozytywną ocenę merytoryczną pracy.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawiona do recenzji dysertacja mgr inż. Łukasza Wajdy pt. „Identyfikacja grzybów dominujących w jabłkach oraz możliwości zahamowania ich wzrostu w napojach jabłkowych poprzez dodatek *Arthrospira platensis*” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnioskuje do Wysokiej Rady o dopuszczanie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Michał Świeca prof. UP