

Warszawa, 26.08.2019r.

Prof. dr hab. Małgorzata Gniewosz
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
Wydział Nauk o Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Wójcik

pt. „Otrzymywanie i charakterystyka białek killerowych z nowo wyizolowanych szczepów drożdży i grzybów drożdżopodobnych w aspekcie biokontroli żywności”

Promotor: Prof. dr hab. Zdzisław Targoński

Ocena formalnej strony pracy

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr inż. Monika Wójcik zastosowała układ charakterystyczny dla prac naukowych. W rozprawie doktorskiej składającej się z 115 numerowanych stron maszynopisu zawarto treści w poszczególnych typowych rozdziałach. Na początku zamieszczono Streszczenie w języku polskim i angielskim. Część teoretyczną dotyczącą przeglądu literatury opracowano na 28 stronach, Hipotezę badawczą i Cel Pracy oraz Materiały i Metody Badań zamieszczono na 22 stronach, Wyniki przedstawiono na 28 stronach wraz z 17 rysunkami, 6 wykresami i 21 tabelami. Dyskusję wyników opracowano na kolejnych 8 stronach, a Wnioski przedstawiono na 2 stronach. Spis literatury liczy 16 stron, obejmujących 201 pozycji literatury w języku polskim i angielskim. Następnie zamieszczono Spis Rysunków i Spis Tabel. Przedstawiony przez mgr inż. Monikę Wójcik układ pracy jest logiczny i bardzo przejrzysty.

Autorka sformułowała **hipotezę badawczą**, iż drożdże i grzyby drożdżopodobne pozyskane z naturalnych środowisk są zdolne do wytwarzania białek killerowych o dotychczas niepoznanych właściwościach antymikrobiologicznych. W celu weryfikacji postawionej hipotezy, mgr inż. Monika Wójcik przyjęła za cel izolację nowych killerowych szczepów drożdży i grzybów drożdżopodobnych oraz określenie środowiskowych uwarunkowań biosyntezy białek killerowych wraz z charakterystyką ich działania. Cel pracy został jasno

sformułowany. **Zakres pracy** obejmował 8 etapów logicznie ułożonych i powiązanych ze sobą; począwszy od pozyskania i selekcji izolatów środowiskowych pod względem ich aktywności killerowej i określeniu przynależności gatunkowej, następnie ustaleniu warunków hodowli szczepów do efektywnego wytwarzania toksyn killerowych, wydzieleniu i oczyszczeniu wybranego białka killerowego, scharakteryzowaniu spektrum aktywności bójczej i określeniu masy molekularnej, a skończywszy na próbie zastosowania preparatu białka killerowego do biokontroli żywności.

Drożdże o fenotypie killerowym są obiektem zainteresowania od wielu lat. Z ekologicznego punktu widzenia killerowość jest zjawiskiem antagonizmu pomiędzy szczepami występującymi w danym środowisku i współzawodniczeniu o substancje pokarmowe w celu jego zdominowania. Właściwości killerowe są dobrym czynnikiem różnicującym niektóre szczepy, np. z rodzaju *Candida*. Poza tym, drożdże killerowe są obiektem zainteresowania przemysłu fermentacyjnego ze względu na to, że liczne infekcyjne elementy cytoplazmatyczne mogące występować w ich komórkach, np. wirusy i priony mogą spełniać funkcje chroniące własne środowisko przed zakażeniami wywołanymi przez bakterie, drożdże, a także pleśnie. Dzięki coraz lepiej poznanemu fenotypowi killerowemu drożdży stało się też możliwe większe ich zastosowanie w gospodarce człowieka. Z tego względu problematyka badawcza podjęta przez mgr inż. Monikę Wójcik w rozprawie doktorskiej jest nie tylko wysoce aktualna, ale i nowatorska. Wiąże się ona z jednej strony z charakterystyką aktywności killerowej różnego pochodzenia drożdży i grzybów drożdżopodobnych, a z drugiej z propozycją zastosowania naturalnego preparatu białkowego o aktywności fungistatycznej do ochrony żywności. Dlatego uważam, że dokonany przez mgr inż. Monikę Wójcik wybór wyżej wymienionych badań należy uznać za uzasadniony.

Tytuł pracy dokładnie odzwierciedla jej treść. Stwierdzam, że praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom dysercyjnym na stopień doktora.

Ocena szczegółowa

Przegląd literatury został wykonany na podstawie zgromadzonej bogatej literatury w liczbie 201 pozycji w języku polskim i angielskim, obejmującej w dużej części publikacje światowe z ostatnich 10 lat.

W *Przeglądzie literatury* podzielonym na trzy podrozdziały omówione zostały zagadnienia związane z charakterystyką wybranych systemów killerowych drożdży i grzybów drożdżopodobnych, zastosowaniem drożdży i toksyn killerowych oraz charakterystyką

gatunku *Aureobasidium pullulans*. Najwięcej uwagi poświęcono omówieniu poznanych toksyn killerowych wytwarzanych przez drożdże należące do 10 rodzajów, z uwzględnieniem budowy, mechanizmów, warunków i spektrum działania toksyn killerowych na wrażliwe komórki drożdży. W kolejnym podrozdziale mgr inż. Monika Wójcik przedstawiła zastosowanie szczepów killerowych w różnych gałęziach przemysłu spożywczego, w celu utrzymania stabilności mikrobiologicznej produktów fermentacyjnych np. win, sake, produktów mleczarskich i kiszonek roślinnych oraz mikrobiologicznej ochronie owoców w trakcie przechowywania, co może przyczynić się do ograniczenia lub zastąpienia chemicznych środków konserwujących w produkcji żywności. Przytoczyła także przykłady potencjalnych zastosowań w medycynie np. do szybkiej identyfikacji patogennych szczepów drożdży, leczeniu grzybic i konstrukcji nowych szczepionek idiotypowych. W trzeciej części tego rozdziału przedstawiono morfologię i występowanie gatunku *A. pullulans*. Dużą uwagę poświęcono także na możliwości zastosowań metabolitów różnych szczepów *A. pullulans* w biotechnologii i w biokontroli. Omówiono zastosowania pullulanu, enzymów, aureobasidanów i melanin w przemyśle spożywczym, a ze względu na silne działanie antagonistyczne w stosunku do grzybów strzępkowych nowe możliwości dla biologicznej ochrony surowców roślinnych. Uważam, że zawarte w części teoretycznej treści pracy świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Autorki do podjęcia badań. Zakres przeglądu, jak i dobór treści jest właściwy i dobrze wprowadza czytelnika w tematykę badawczą rozprawy.

W kolejnym rozdziale mgr inż. Monika Wójcik przedstawiła materiały i metodykę badań mikrobiologicznych i fizykochemicznych wraz z dokładnymi opisami metod analitycznych, obliczeń i opracowania statystycznego wyników. Materiałem biologiczny pracy było 165 izolatów drożdży i grzybów drożdżopodobnych. Pozostały materiał biologiczny to 15 szczepów referencyjnych pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Czystych Kultur ARS oraz 68 szczepów z Kolekcji Czystych Kultur Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka UP w Lublinie oraz 5 szczepów z Niemieckiej Kolekcji Drobnoustrojów (DSM).

Najpierw opisano metody selekcji i identyfikacji szczepów pod względem aktywności killerowej, następnie metody hodowli wybranych izolatów, oczyszczania toksyny killerowej, wyznaczenia masy molekularnej, składu aminokwasowego i spektrum działania białka killerowego. Metody te zostały zaczerpnięte z literatury i mgr inż. Monika Wójcik powołuje się na materiały źródłowe. Do ustalenia aktywności killerowej badanych szczepów Doktorantka zastosowała zmodyfikowaną metodę studzienkową. Pozostałe metody zostały szczegółowo opisane, z podaniem źródła literaturowego wraz z ewentualnymi modyfikacjami

metod. Opisano też metodę analityczną opierającą się na technikach chromatograficznych tj. chromatografia jonowymienna, chromatografia oddziaływań hydrofobowych oraz sączenie molekularne. Określenie składu aminokwasowego białka killerowego przeprowadzono metodą spektrometrii mas. W ostatnim etapie pracy oceniono przydatność preparatu toksyny killerowej do zwalczania grzybów pleśniowych na sztucznie inokulowanych owocach według metody literaturowej z własnymi modyfikacjami.

Bardzo wysoko oceniam oryginalność metod badawczych i trud włożony w ich wykonanie.

Omówienie wyników Autorka podzieliła na trzy podrozdziały. Kolejność doświadczeń tworzy logiczny ciąg od określenia izolacji drożdży i grzybów drożdżopodobnych, screeningu izolatów pod względem aktywności killerowej do charakterystyki białka killerowego pochodzącego z najlepszego izolatu (*A. pullulans*). Przedstawienie wyników potwierdza opanowanie przez mgr inż. Monikę Wójcik warsztatu naukowego niezbędnego do realizacji założonych w pracy doktorskiej badań.

W pierwszym etapie pracy wyizolowano 165 czystych kultur drożdży i grzybów drożdżopodobnych z różnych naturalnych środowisk, przy czym najwięcej izolatów pochodziło z winorośli odmiany ciemnej, kłosów pszenicy oraz winogron odmiany ciemnej. Spośród nich, 51 izolatów wykazywało fenotyp killerowy w stosunku do co najmniej jednego szczepu wrażliwego. Na bazie uzyskanych wyników do kolejnego etapu pracy Doktorantka wybrała grupę 10 izolatów o najsilniejszym działaniu antagonistycznym, które zostały genetycznie zidentyfikowane. Stwierdzono, że 7 szczepów należało do rodzaju *Metschnikowia*, 2 do rodzaju *Aureobasidium* i jeden do *Schwanniomyces*. Z hodowli tych szczepów wyodrębniono preparaty białkowe i oceniono ich aktywność killerową wobec referencyjnego szczepu *K. lactis* Y-6682. Najsilniej działał preparat białkowy pochodzący z hodowli *A. pullulans*, natomiast dwa preparaty nie hamowały wzrostu szczepu *K. lactis* Y-6682. W odniesieniu do wyników tych doświadczeń nasuwa się pytanie: *Dlaczego preparaty białkowe pozyskane po hodowli izolatu 2 i izolatu 20b nie hamowały szczepu referencyjnego A7, mimo, że te same izolaty początkowo miały taką aktywność (Tab. 11) ?*

W następnej części pracy, badania skoncentrowano na białku killerowym wytwarzanym przez szczep *A. pullulans*-32a tj. charakteryzującym się najsilniejszą aktywnością killerową. Najpierw dobierano warunki hodowli *A. pullulans*-32a, tak by zmaksymalizować biosyntezę toksyny killerowej, a następnie określono wpływ wybranych parametrów na aktywność preparatu toksyny wobec szczepu referencyjnego *K. lactis* Y-6682. Stwierdzono, że hodowla *A. pullulans*-32a w temperaturze 22°C, w podłożu zawierającym 10g NaCl /L i pH 4,5 i 5,0 zapewnia największą aktywność killerową tego szczepu. Toksyna killerowa wykazywała

aktywność w zakresie temperatur od 18 do 28°C, z optimum 22°C oraz w podłożu o pH od 3,5 do 5,0 i przy zawartości NaCl, wynoszącym 10g/L. Następnie udowodniono szerokie spektrum działania toksyny. Spośród 13 rodzajów testowych grzybów strzępkowych oraz 7 rodzajów drożdży toksyna działała antagonistycznie wobec szczepów należących do *Aspergillus* i *Penicillium* oraz *Candida*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Pachysolen*, *Trichosporon* i *Dekkera*. W odniesieniu do wyników tych doświadczeń nasuwa się pytanie: *Czy niska stabilność toksyny w temperaturach poniżej 18°C i powyżej 28°C oraz pH powyżej 5,0 może być ograniczeniem jej użycia jako naturalnego konserwanta żywności ?*

Bardzo interesującym etapem rozprawy było oczyszczenie toksyny killerowej *A. pullulans*-32a, przy użyciu różnych technik, w tym chromatografii jonowymiennej, chromatografii oddziaływań hydrofobowych połączonej z sączeniem molekularnym. Zamierzony efekt oczyszczania przyniosła druga metoda, a spośród pięciu otrzymanych frakcji jedna miała aktywność killerową. Ustalono, że odpowiadające tej frakcji białko miało masę molekularną na poziomie 12 kDa, a na podstawie porównania sekwencji aminokwasowej stwierdzono homologię toksyny z proteiną *A. pullulans* EXF-150 (baza NCBI) na poziomie 36%.

Następnie Doktorantka podjęła próbę zastosowania toksyny killerowej *A. pullulans*-32a w bioochronie surowców roślinnych. Efekt fungistatyczny toksyny badano na sztucznie inokulowanych zarodnikami trzech szczepów *A. niger* truskawkach, gruszkach i jabłkach, które zostały następnie zabezpieczone preparatem toksyny killerowej. Stwierdzono zahamowanie wzrostu grzybni na wszystkich owocach w zakresie od 38% do 99% w zależności od szczepu *A. niger*. Nasuwa się pytanie: *Czy celowe byłoby użycie inokulum szczepu A. pullulans-32a zamiast preparatu toksyny killerowej do ochrony owoców przed rozwojem pleśni, zważywszy na koszty otrzymywania takiego preparatu?*

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedyskutowała uzyskane wyniki na tle publikacji naukowych z ostatnich lat, w sposób bardzo dojrzały, co świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu. W ostatnim rozdziale mgr inż. Monika Wójcik sformułowała dziesięć wniosków. W mojej opinii wnioski są prawidłowe, zawierają najważniejsze konkluzje wynikające z pracy.

Oceniając pracę doktorską mgr inż. Moniki Wójcik pod względem merytorycznym uważam, że jej wyniki stanowią duży krok naprzód w poznawaniu i zrozumieniu zjawiska antagonizmu wśród grzybów. Autorka w sposób konsekwentny zrealizowała zaplanowane zadania, wykorzystując w tym celu szeroki i bardzo nowoczesny warsztat badawczy. Wyniki badań są zinterpretowane prawidłowo oraz bardzo ciekawie i szczegółowo przedyskutowane z wynikami innych autorów. Dużym sukcesem przedstawionych badań jest wykazanie

celowości praktycznego zastosowania preparatu toksyny killerowej *A. pullulans*-32a do ograniczenia wzrostu grzybów strzępkowych na świeżych owocach. Sposób ten może przyczynić się do zmniejszenia strat żywności i jest to znaczący praktyczny aspekt niniejszej rozprawy.

Oceniając rozprawę doktorską pod względem formalnym, odnotowuję jej tradycyjny układ, z dobrze opracowanymi ilustracjami i tabelami oraz dużą przejrzystością narracji. Autorka nie ustrzegła się drobnych uchybień z niewłaściwie użytymi terminami np. zamiast „ilość” powinna być „liczba”, analogicznie zamiast „odporność” powinno być „oporność”.

Podsumowanie

Recenzowana praca doktorska mgr inż. Moniki Wójcik pt. „Otrzymywanie i charakterystyka białek killerowych z nowo wyizolowanych szczepów drożdży i grzybów drożdżopodobnych w aspekcie biokontroli żywności” stanowi istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat nowych, preparatów białkowych pochodzenia mikrobiologicznego skutecznych w bioochronie żywności. W sposób szczególny podkreślam szeroki zakres pracy doświadczalnej wykonanej na dużej liczbie szczepów, co niewątpliwie wymagało bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego i przygotowania teoretycznego mgr inż. Moniki Wójcik w zakresie mikrobiologii i analizy chemicznej.

Praca doktorska spełnia wymogi zawarte w Ustawie (Dz. U. Nr 65, poz. 595, art.13.1 ustawy z dnia 14.03.2003r.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stypendiach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r., poz. 1789), zgodnie z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3.07.2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym Dz.U. z 2018r. poz. 1669) w związku z tym stawiam wniosek o dopuszczenie mgr inż. Moniki Wójcik do publicznej obrony i dalszych etapów przewodu doktorskiego.

