

prof. UPP dr hab. inż. Wojciech Białas
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

Poznań, 26.01.2022r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Adamczyk
pt. „Ocena właściwości prebiotycznych hydrolizatu (1→3)- α -D-glukanów wyizolowanych
z owocników żółciaka siarkowego (*Laetiporus sulphureus*)”

wykonanej w Instytucie Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

pod kierunkiem

dr hab. Adriana Wiater, prof. UMCS (promotor) oraz dr hab. Marty Kingi Lemieszek (promotor
pomocniczy)

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest pismo Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Pani prof. dr hab. Anny Jarosz-Wilkolażka z dnia 13.12.2021r., w którym poinformowała mnie, że decyzją Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych zostałem powołany na recenzenta ww. pracy.

Dobór i znaczenie tematu

Przez ostatnie dwie lub trzy dekady nauczyliśmy się bardzo dużo o naszej mikrobiocie jelitowej. Wiemy, że odgrywa ona kluczową rolę w wielu chorobach i zaburzeniach, które występują u ludzi. Najnowsze badania naukowe pokazują, że mamy do czynienia z istotnymi różnicami w składzie mikrobioty jelitowej między osobami zdrowymi, a cierpiącymi, na przykład na nieswoiste zapalenie jelit, zespół jelita drażliwego, nowotwory, a nawet choroby lub zaburzenia niezwiązane bezpośrednio z jelitami, takie jak alergie czy autyzm. Wynika to z interakcji mikrobioty z gospodarzem zachodzących na wielu różnych poziomach. Mikrobiota ma choćby istotny wpływ na modulację układu odpornościowego gospodarza, jest odpowiedzialna za powstawanie wielu metabolitów, które mogą mieć wpływ sięgający zdecydowanie poza układ pokarmowy, w którym bytują. Skład, a co za tym idzie aktywność mikrobioty jelitowej, zależy w dużej mierze od diety oraz przyjmowanych leków. Niektóre składniki żywności, takie jak

prebiotyki, błonnik lub polifenole, mogą być źródłem prozdrowotnych metabolitów lub sprzyjać ich biosyntezie, podczas gdy np. nadmiar białka w diecie może prowadzić do produkcji substancji powszechnie uważanych za toksyczne. Odpowiednio zbilansowana dieta wzbogacona o nowe prebiotyki może w niedalekiej przyszłości okazać się głównym narzędziem w walce z nękającymi nas chorobami cywilizacyjnymi. Mając to na uwadze za celowe należy uznać badania naukowe ukierunkowane na poszukiwanie oraz dogłębną charakterystykę nowych bądź doskonalenie istniejących preparatów prebiotycznych. W ten nurt doskonale wpisuje się rozprawa doktorska Pani Pauliny Adamczyk, która stanowi kompleksowe opracowanie na temat pozyskiwania oraz właściwości nowych preparatów prebiotycznych produkowanych na bazie hydrolizatów (1→3)- α -D-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego. Biorąc pod uwagę te aspekty uważam, że podjęta przez Panią Adamczyk tematyka badań jest bardzo aktualna i ma szeroko zakrojony wymiar poznawczy oraz aplikacyjny.

Ocena strony formalnej pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi bardzo obszerny materiał, liczący aż 182 strony maszynopisu. W pracy zamieszczono 10 tabel oraz 47 rycin, na które składają się liczne wykresy, rysunki oraz zdjęcia stanowiące opracowanie własne dokumentujące wykonane badania. Struktura rozprawy jest typowa dla prac o charakterze doświadczalnym. Rozprawa jest podzielona na 11 rozdziałów, w których przedstawiono przegląd literatury, cel pracy, materiały i metody badawcze, omówienie wyników badań, dyskusję, wnioski końcowe oraz spis literatury, rycin, tabel i krótką prezentację dokonań naukowych Autorki. Poza tym w rozprawie zamieszczono streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych w pracy skrótów. W pracy zacytowano 206 pozycji literaturowych oraz 3 źródła odnoszące się do stron internetowych. Mimo, iż część spośród cytowanych pozycji pochodzi z przed kilku dekad, to są one właściwie dobrane pod względem merytorycznym.

Tytuł rozprawy doktorskiej doskonale odzwierciedla jej treść. Wprowadzenie do pracy jest bezpośrednio powiązane z celem badań. Omówienie wyników badań jest bardzo szczegółowe, natomiast dyskusję można określić jako rzeczową i dojrzałą. Pod względem redakcyjnym oraz graficznym praca jest przygotowana bardzo starannie, choć w kilku miejscach zdarzyły się Autorce drobne błędy w postaci literówek, niepoprawnych końcówek wyrazów, czy błędnych oznaczeń rycin (np. strony: 15, 42, 137), co w żaden sposób nie umniejsza merytorycznej wartości recenzowanej pracy.

W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia wymagania formalne stawiane pracom dysercyjnym na stopień naukowy doktora, ma bowiem charakter eksperymentalny i zawiera

wszystkie niezbędne rozdziały, które uszeregowano w sposób typowy dla prac o charakterze doświadczalnym.

Ocena merytoryczna pracy

Recenzowana praca autorstwa mgr Pauliny Adamczyk dotyczy otrzymania preparatu (1→3)- α -D-glukooligosacharydów na drodze kontrolowanej hydrolizy (1→3)- α -D-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego oraz charakterystyki uzyskanego preparatu pod kątem wymagań stawianych prebiotykom. Pracę rozpoczyna 28 stronicowy wstęp literaturowy, który wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy. Wstęp składa się sześciu podrozdziałów. W pierwszej części Autorka przedstawiła charakterystykę żółciaka siarkowego stanowiącego przedmiot badań oraz jego właściwości terapeutyczne. W opisie Autorka zwróciła szczególną uwagę na to, że grzyby wielkoowocnikowe, do których należy żółciak siarkowy, dostarczają wielu różnorodnych metabolitów wykazujących nie tylko znaczną aktywność przeciwdrobnoustrojową, ale także przeciwutleniającą. Szczegółowo omówiła także budowę grzybowych (1→3)- α -D-glukanów oraz mechanizm ich biosyntezy i potencjalną rolę w funkcjonowaniu mikroorganizmów. Ze względu na tematykę badań ten fragment pracy uważam za bardzo wartościowy. Podkreśla on duży potencjał aplikacyjny substancji obecnych w grzybach wielkoowocnikowych i wskazuje aktualne kierunki badań związane z ich wykorzystaniem. Tutaj nasuwa się pytanie do Autorki, czy którykolwiek spośród poznanych już metabolitów grzybowych pochodzących z żółciaka siarkowego lub podobnych mu grzybów wielkoowocowych doczekał się wdrożenia?

W dalszej części wstępu doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat mikroflory przewodu pokarmowego. W opisie wspomniała, że wśród mikroorganizmów bytujących w przewodzie pokarmowym człowieka znajdują się zarówno bakterie pożyteczne dla jego zdrowia (pałeczki z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*), oportunistyczne (pałeczki z rodzaju *Bacteroides*), jak i chorobotwórcze (bakterie z rodzaju *Clostridium*, *Staphylococcus* i *Pseudomonas*). Na zakończenie tej części wstępu Autorka słusznie podkreśliła, że nieocenione w utrzymaniu korzystnego dla zdrowia składu mikrobiomu, są probiotyki, prebiotyki i synbiotyki, produkty zaliczane do żywności funkcjonalnej, definiowanej jako żywność o udokumentowanym badaniami naukowymi - korzystnym wpływie na zdrowie. Szczególnie wiele miejsca Autorka poświęciła omówieniu prebiotyków, stanowiących przedmiot badań recenzowanej rozprawy. W opisie uwzględniła wszystkie kryteria, jakie muszą spełniać badane substancje, by można było je zaklasyfikować do prebiotyków. Autorka trafnie zauważyła, że oprócz pozytywnego wpływu na zdrowie gospodarza, prebiotyki charakteryzują się cennymi, z

punktu widzenia technologii produkcji żywności, właściwościami fizykochemicznymi. Autorka wiele miejsca poświęciła także omówieniu nazewnictwa badanych związków chemicznych, podkreślając przy tym, że proponowana w dostępnej literaturze nomenklatura jest dosyć niejednoznaczna, co dodatkowo pokazuje, że podjęta tematyka badawcza jest nowa i wiele jest tutaj jeszcze do zrobienia. Podsumowując uważam, że treść przeglądu literaturowego wskazuje na doskonałe przygotowanie merytoryczne Pani Pauliny Adamczyk do realizacji badań, a nieliczne błędy edytorskie nie umniejszają wartości merytorycznej tej części rozprawy doktorskiej.

Opis zastosowanych materiałów oraz metod badawczych, analitycznych i statystycznych został zawarty w rozdziale „Materiały i metody”. Autorka podzieliła go na osiem podrozdziałów, w których bardzo precyzyjnie opisała poszczególne metody stosowane na kolejnych etapach realizacji swojej pracy doktorskiej. W mojej opinii dobór metod oraz sposób ich wykorzystania jest prawidłowy. Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykorzystania bardzo nowoczesnych metod analitycznych pozwalających na kompleksową analizę nierozpuszczalnych w wodzie frakcji polisacharydowych wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego za pomocą zastosowanej w pracy ekstrakcji alkalicznej. Autorka w sposób kompleksowy podeszła także do charakterystyki uzyskanych preparatów prebiotycznych. Poza metodami pozwalającymi na weryfikację czy badany preparat spełnia wymogi stawiane prebiotykom, określiła także ich wpływ na rozwój mikroflory odpowiedzialnej za próchnicę zębów. Dokonała także oceny chemoprewencyjnych i immunomodulacyjnych właściwości wspomnianych preparatów. W tym miejscu nasuwają mi się dwa pytania, z których jedno dotyczy wyboru metody hodowli paciorkowców próchniczotwórczych opisanej w pkt. 3.7.3.1.c. Dlaczego na tym etapie badań nie wykorzystano do hodowli automatycznego czytnika wzrostu mikroorganizmów Bioscreen C Microbiology Reader, pozwalającego na ciągły monitoring wzrostu komórek? Drugie pytanie związane jest opisane w pkt. 3.7.3.3.a sposobem przygotowania do badań roztworów cukrów, w tym także wytworzonych w trakcie realizacji pracy doktorskiej (1→3)- α -GOS. Zakładam, że skoro filtrację sterylną poprzedzało wirowanie przy $12\ 000 \times g$, to próbki badanych substancji charakteryzowały się obniżoną rozpuszczalnością. Czy analizowano ten parametr i jaki to mogło mieć wpływ na rzeczywiste stężenie badanych substancji w roztworach wykorzystywanych do badań?

Poprawne zaplanowanie badań i konsekwentna ich realizacja przez doktorantkę dostarczyła wielu bardzo ciekawych i oryginalnych wyników, istotnych nie tylko pod względem poznawczym, ale także aplikacyjnym. Punktem wyjścia podjętych badań był dobór odpowiedniego źródła (1→3)- α -D-glukanów, które miały być bazą do otrzymania mieszaniny

oligosacharydów. Autorka przedstawiła szczegółową charakterystykę 29 różnych owocników żółciaka siarkowego, które pozyskano zarówno ze środowiska naturalnego, jak i uprawy kontrolowanej. Za pomocą zaawansowanych technik instrumentalnych wykazała, że nierozpuszczalne w wodzie polisacharydy wyizolowane na drodze ekstrakcji alkalicznej, to liniowe (1→3)- α -D-glukany o niewielkim stopniu rozgałęzienia. Stwierdziła także, że otrzymanie preparatów o podobnym składzie oligosacharydów, wymaga użycia glukanów izolowanych z owocników żółciaka siarkowego pochodzących ze stanowisk naturalnych. W tym miejscu chciałbym zauważyć, że bardzo ciekawym elementem pracy była próba hodowli żółciaka siarkowego w warunkach kontrolowanych. Bardzo często w pracach naukowych pojawiają się informacje dotyczące ciekawych właściwości nowoodkrytych substancji izolowanych z źródeł naturalnych takich jak rośliny, czy grzyby. Niestety w wielu przypadkach są to gatunki zagrożone wyginięciem lub mające ograniczoną liczbę naturalnych stanowisk. Rzadko kiedy pojawia się refleksja na temat dostępności badanych substancji w przypadku ewentualnego wprowadzenia ich do obrotu na szeroką skalę. Podjęte przez Autorkę rozprawy badania mające na celu wyhodowanie żółciaka siarkowego w warunkach kontrolowanych stanowiły swego rodzaju próbę udowodnienia, że możliwa jest hodowla tego grzyba na skalę przemysłową i tym samym zapewnienie stałej dostępności surowca do produkcji opisywanych prebiotyków. Niestety w pracy zabrakło mi zdecydowanych konkluzji związanych z tymi badaniami. W oparciu o przedstawione wyniki mogę jedynie zakładać, że próbę tę należy zaliczyć do nieudanych i że ostateczne rozwiązanie problemu hodowli żółciaka siarkowego wymaga dalszych badań.

W dalszej części pracy Autorka opisuje wyniki badań związanych z kwaśną hydrolizą (1→3)- α -D-glukanów za pomocą 0,1 M H₂SO₄. Analiza ilościowa i jakościowa produktów hydrolizy wykonana w oparciu o techniki HPLC oraz MALDI-TOF MS wykazała, że preparat zawierał 14,4% glukozy, 84,2% oligosacharydów o stopniu polimeryzacji od 2 do 9 i 1,4% (1→3)- α -D-glukooligosacharydów o SP większym od 9. Mimo, iż proces hydrolizy (1→3)- α -D-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego był prowadzony 3-krotnie to końcowy odzysk preparatu w formie liofilizatu wynosił niespełna 12% w stosunku do wyjściowej ilości polisacharydów obecnych w surowcu. W tym miejscu na uwagę zasługuje zaprezentowana przez Autorkę rozprawy bardzo wnikliwa analiza potencjalnych przyczyn uzyskania relatywnie niskiej wydajności procesu hydrolizy.

Bardzo oryginalny charakter miały też kolejne badania doktorantki, których przedmiotem była ocena wyprodukowanego preparatu prebiotycznego pod kątem jego potencjału kariogennego. W tym celu doktorantka określiła wpływ preparatu na wzrost wybranych bakterii próchnicotwórczych oraz oceniła ich zdolność do biosyntezy mutanu i

formowania sztucznej płytki nazębnej w postaci biofilmu sacharozo-zależnego. Na uwagę zasługuje fakt, iż w badaniach poza preparatem (1→3)- α -GOS wykorzystano także powszechnie stosowane zamienniki cukru oraz dostępny komercyjnie preparat prebiotyczny zawierający w swoim składzie fruktooligosacharydy (FOS). Jak wykazano stymulacja wzrostu bakterii próchnicotwórczych przez (1→3)- α -GOS była słabsza niż stymulacja po zastosowaniu podłoża z glukozą lub komercyjnymi zamiennikami. Udowodniono także, że zastosowanie w hodowlach komercyjnego preparatu FOS, w przypadku wszystkich badanych bakterii, powodowało zdecydowanie silniejszą stymulację wzrostu mikroorganizmów niż w przypadku zastosowania hydrolizatu (1→3)- α -D-glukanów. Ocena wpływu (1→3)- α -GOS na syntezę mutanu oraz formowanie biofilmów sacharozo-zależnych przez paciorkowce próchnicotwórcze, wykazała jednoznacznie, że cukry zawarte w tym preparacie nie biorą udziału w tych procesach. Tym samym Autorka udowodniła, że uzyskany w trakcie realizacji pracy doktorskiej preparat może być z powodzeniem stosowany w różnego rodzaju produktach spożywczych.

Równie interesujące były szeroko zakrojone badania mające na celu weryfikację podstawowych wymagań stawianych prebiotykom. Doktorantka wykazała między innymi, że badany preparat (1→3)- α -GOS nie promuje wzrostu bakterii patogennych takich jak *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis*. Przeprowadzone analizy wykazały ponadto częściową oporność preparatu na trawienie w górnych odcinkach przewodu pokarmowego. Co istotne badany hydrolizat (1→3)- α -D-glukanów silniej stymulował wzrost bakterii fermentacji mlekowej należących do rodzajów *Bifidobacterium* oraz większości z rodzaju *Lactobacillus* aniżeli komercyjne prebiotyki takie jak inulina i wspomniane wcześniej FOS. Ponadto, badany preparat wykazywał korzystny wpływ na zdrowie gospodarza, m. in. stymulował wytwarzanie kwasu mlekowego oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) przez bakterie należące do rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Warto zauważyć, że preparat (1→3)- α -GOS scharakteryzowano także pod kątem jego właściwości chemoprewencyjnych i immunomodulacyjnych. Udowodniono, że zmniejszał on żywotność i podziały komórek raka okrężnicy linii LS180 i HT-29 nie będąc jednocześnie toksycznym względem komórek nabłonka jelita grubego linii CCD 841CoN. W trakcie badań wykazano ponadto, że preparat istotnie zwiększał zdolność ludzkich komórek NK linii NK-92 do rozpoznawania i eliminowania komórek raka okrężnicy linii LS180 i HT-29, co sugeruje jego immunomodulacyjne właściwości. Podsumowując tę część rozprawy pragnę stwierdzić, że omówienie wyników badań jest bardzo szczegółowe, a jedyną wadą tego rozdziału przyczyniającą się do nadmiernego powiększenia objętości całej rozprawy są powtórzenia opisów metodyk stosowanych na niektórych etapach badań.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” Doktorantka przeprowadziła szczegółową dyskusję zaprezentowanych danych eksperymentalnych, trafnie nawiązując do badań innych naukowców zajmujących się podobną tematyką. Sposób dyskusji wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki oraz bardzo dobrą znajomość literatury naukowej dotyczącej zagadnień stanowiących przedmiot rozprawy. Ostatnim elementem rozprawy są dość obszerne wnioski, które stanowią kompleksowe podsumowaniem uzyskanych wyników. Liczba wniosków jest zgodna z liczbą szczegółowych celów badań zaprezentowanych wcześniej w rozdziale „Cel pracy”.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa zawiera wiele elementów nowości naukowej, które wyraźnie rozszerzają wiedzę na temat preparatów prebiotycznych produkowanych na bazie hydrolizatów (1→3)- α -D-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego. Oprócz istotnych walorów poznawczych rozprawa doktorska mgr Pauliny Adamczyk ma wyraźne praktyczne ukierunkowanie, co stanowi jej niezaprzeczalny atut. Treść rozprawy pokazuje też wyraźnie, jak trudnym zadaniem jest otrzymanie aktywnego preparatu prebiotycznego przeznaczonego do praktycznych zastosowań.

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Adamczyk pt. „Ocena właściwości prebiotycznych hydrolizatu (1→3)- α -D-glukanów wyizolowanych z owocników żółciaka siarkowego (*Laetiporus sulphureus*)”, spełnia warunki określone w art. 13. Ust. 1 z dnia 14 marca 2013 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (*Dz. U z 2016, poz. 882*). W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o przyjęcie tej pracy i dopuszczenie Pani mgr Pauliny Adamczk do dalszych etapów postępowania związanego z ubieganiem się o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie mając na uwadze bardzo wysoką wartość naukową ocenianej pracy wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych o jej wyróżnienie. Rozprawa Pani mgr Pauliny Adamczak doskonale łączy aspekty naukowe i praktyczne. Proponowane wyróżnienie jest poza tym wyrazem mojego uznania dla doktorantki za ilość pracy włożonej w powstanie recenzowanej rozprawy oraz duże umiejętności analityczne wymagające zapewne szczególnego zaangażowania.

Wojciech Piątek