



Politechnika Łódzka

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

prof. dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

Łódź, 16.08.2021

Ocena

pracy doktorskiej mgr inż. **Katarzyny Pobiegi**

nt. „**Studia nad aktywnością przeciwdrobnoustrojową
powłok pullulanowo-propolisowych na wybranym surowcu roślinnym**”

wykonanej

w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, w Instytucie Nauk o Żywności,
Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Promotor: prof. dr hab. inż. Małgorzata Gniewosz
Promotor pomocniczy: dr inż. Karolina Kraśniewska

Podstawa formalna

Ocenę, której przedmiotem jest rozprawa doktorska nt. „Studia nad aktywnością przeciwdrobnoustrojową powłok pullulanowo-propolisowych na wybranym surowcu roślinnym” wykonano na zlecenie Rady Dyscypliny Technologia żywności i żywienia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, która powierzyła mi recenzję rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Pobiegi.

Wybór i znaczenie tematu

Według Piramidy Żywieniowej opublikowanej w roku 2016 przez Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie podstawę diety dorosłego człowieka powinny stanowić warzywa i owoce. Przedstawiony w roku 2020 na V Narodowym Kongresie Żywieniowym model Talerza Zdrowia, będącego graficzną ilustracją zaleceń zdrowego żywienia Państwowego Zakładu Higieny, wizualizuje talerz w połowie zajęty przez warzywa i owoce. Zgodnie z tymi trendami, konsumenci oczekują od producentów dostarczenia świeżych i nieprzetworzonych warzyw i owoców, zachowujących świeżość i walory żywieniowe w długich okresach od

1

zakupu. Jednym z rozwiązań jest pokrywanie surowców roślinnych jadalnymi powłokami, zabezpieczającymi przed zmianami fizyko-chemicznymi oraz zepsuciem mikrobiologicznym. Wśród szerokiego wachlarza surowców dedykowanych do wytworzenia filmów i folii dla przemysłu spożywczego poczesne miejsce zajmuje pullulan. Wybór pullulanu jako polimeru stanowiącego bazę jadalnych powłok jest uzasadniony nie tylko jego walorami reologicznymi i neutralnością organoleptyczną, ale również aktywnością biologiczną, tj. aktywnością przeciwdrobnoustrojową, działaniem probiotycznym, stymulacją odpowiedzi immunologicznej, obniżeniem poziomu cholesterolu i trójglicerydów. Nie bez znaczenia jest też jego biodegradowalność i pozyskiwanie na drodze biotechnologicznej. W dobie dramatycznego kryzysu klimatycznego, szczególny nacisk kładzie się na wykorzystanie na skalę przemysłową surowców funkcjonalnych biologicznie o jak najmniejszym śladzie węglowym. Chociaż propolis ze względu na swoją aktywność biologiczną budzi zainteresowanie człowieka od wielu lat, to nadal nie jest szeroko wykorzystywany w żywieniu człowieka. Charakterystyka propolisu pochodzącego z różnych rejonów Polski oraz użycie do modyfikacji powłoki pullulanowej jest pierwszą próbą jego wykorzystania w technologii żywności. Pani mgr inż. Katarzyna Pobiega koncentrując się na modyfikacji filmu pullulanowego ekstraktem propolisu podjęła się zaprojektowania i weryfikacji funkcji ochronnej powłoki jadalnej wytworzonej z naturalnych komponentów o cechach żywności funkcjonalnej. Przedstawione w ramach pracy doktorskiej badania wpisują się doskonale w trend nowoczesnej technologii żywności i żywienia, z uwzględnieniem aspektów ekologicznych i naciskiem na wykorzystanie surowców pochodzenia naturalnego. Wybór tematu pracy uważam za w pełni zasadny, a zastosowanie propolisu do wydłużenia trwałości żywności pochodzenia roślinnego jest podejściem innowacyjnym.

Ocena formalna pracy

Praca doktorska mgr inż. Katarzyny Pobiegi obejmuje 164 strony, w tym 59 stron prezentacji wyników badań w języku polskim wraz z komentarzem i zestawieniem piśmiennictwa. Kolejne sześć stron zajmuje zestawienie dorobku naukowego Doktorantki. Publikacje, w języku angielskim, stanowiące rozprawę doktorską zostały zamieszczone na 62 nienumerowanych stronach. W rozprawie wydzielono 11 głównych rozdziałów, z czego trzon stanowią: Wstęp, Przegląd piśmiennictwa, Hipoteza badawcza i cel pracy, Materiały i metodyka, Wyniki badań i ich omówienie, Wnioski, Spis piśmiennictwa, Dorobek naukowy, Publikacje oraz Oświadczenia współautorów publikacji. Pozostałe części to streszczenia

w języku polskim i języku angielskim, spis treści oraz zestawienie artykułów składających się na rozprawę doktorską. Pod względem edytorskim, tekst rozprawy podzielony jest na dwa elementy, gdzie zbiór artykułów stanowiących dysertację poprzedzony jest zwięzłym omówieniem, zawierającym odniesienia do poszczególnych publikacji oraz prowadzącym czytelnika kolejno przez wszystkie etapy badań. Dokumentacja zawarta w części stanowiącej komentarz do zestawu publikacji składających się na rozprawę doktorską obejmuje 8 tabel oraz 14 rysunków, w tym 5 grafik, 3 fotografie i 6 wykresów. Komentarz do publikacji napisany jest ładnym językiem, kompetentnie przedstawiając etapy pracy i przejrzyście wyjaśniając motywy decyzji dotyczących podjętych kierunków badań. Materiał ilustracyjny jest starannie dobrany i dokumentuje zarówno ścieżkę badawczą, jak i osiągnięcia pracy. Grafiki zamieszczone w „Przeglądzie piśmiennictwa” oraz „Materiałach i metodyce” przekonująco ilustrują kluczowe zagadnienia podjętego tematu oraz sposób jego realizacji. Sekcja nosząca tytuł „Wyniki badań i ich omówienie” płynnie łączy prezentację wyników badań z dyskusją, precyzyjnie lokując własne osiągnięcia na tle badań opisanych w literaturze. Ta część pracy jednoznacznie świadczy o dogłębnej znajomości tematu oraz wysokich kompetencjach naukowych Doktorantki.

Przedstawiona do oceny praca doktorska oparta jest na homogennym zbiorze pięciu monotematycznych publikacji (A1-A5) w czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku wpływu Impact factor równym 24,468 (zgodnie z rokiem opublikowania). Czasopisma, w których ukazały się publikacje objęte rozprawą doktorską są dedykowane dla dyscypliny Technologia żywności i żywienia według Wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów (*załącznik do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 18 grudnia 2019 r.*), a ich sumaryczna ocena parametryczna wynosi 540 punktów. Publikacje pochodzą z ostatnich trzech lat: trzy z roku 2019 (A1, A2 i A3), jedna z roku 2020 (A4) oraz jedna z roku 2021 (A5). Wszystkie publikacje są wieloautorskie, od 3 do 7 autorów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach i autorem korespondencyjnym w czterech publikacjach (A2, A3, A4, A5). Pani mgr Katarzyna Pobiega deklaruje udział 60% w jednej publikacji (A3), 70% udział w trzech publikacjach (A1, A2, A5) oraz 75% udział w jednej publikacji (A4). Wszystkie artykuły ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, koncentrujących się na zagadnieniach technologii żywności i żywienia. Wysokie pozycjonowanie tych czasopism w dyscyplinie świadczy o aktualności i wartości

badania prowadzonych przez Panią Katarzynę Pobiegę. Przeważający indywidualny udział procentowy Pani Magister w tworzeniu koncepcji badań, ich realizacji, interpretacji wyników oraz tworzeniu manuskryptu świadczy o ponadprzeciętnym zaangażowaniu i wiodącej roli Doktorantki.

Ocena merytoryczna pracy

Zwięzłe, jednostronicowe streszczenie pracy przedstawia kierunek poszukiwań badawczych i efekty ich realizacji poprzez opracowanie metody otrzymywania ekstraktu propolisu o wysokiej aktywności biologicznej oraz jego zastosowaniu do tworzenia powłok pullulanowo-propolisowych, przeznaczonych do wydłużenia trwałości przechowalniczej surowców roślinnych. Autorka wskazuje na bezpośrednie powiązanie wyników badań podstawowych z ich aspektem aplikacyjnym, podkreślając korzystny wpływ powłok pullulanowo-propolisowych na zachowanie walorów organoleptycznych i potencjału przeciwdrobnoustrojowego na przykładach pomidorów koktajlowych i borówki amerykańskiej.

Pani mgr Katarzyna Pobiega na stronach Wstępu i Przeglądu piśmiennictwa przedstawia wyczerpująco aktualny stan wiedzy w obszarze tworzenia powłok jadalnych, ich modyfikacji i wykorzystania w technologii żywności, ze szczególnym zastosowaniem pullulanu jako polimeru o optymalnych cechach. Zwracam uwagę na uwzględnienie aspektu ekonomicznego tego surowca, jego dostępności i globalnych perspektyw wykorzystania również w konserwacji żywności. Taka analiza wskazuje na kompleksowe podejście do badań naukowych, już na etapie ich planowania i racjonalne wiązanie z aspektami aplikacyjnymi w dalszej perspektywie. Interesujący jest wybór propolisu jako źródła substancji bioaktywnych. Propolis jest uznawany powszechnie jako cenne źródło związków działających prozdrowotnie i przeciwdrobnoustrojowo, choć jego zastosowanie na skalę przemysłową wiąże się z założeniem braku idealnej powtarzalności składu ilościowego i jakościowego. Szerokie studia literaturowe skoncentrowane na możliwości zastosowania propolisu jako substancji działającej antyoksydacyjnie i wspomagającej konserwację żywności przedstawiono w publikacji A1:

- **A1:** Pobiega K., Kraśniewska K., Gniewosz M. 2019. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science & Technology* 83, 53-62.

Poczesne miejsce w tej publikacji zajmują dane literaturowe na temat wpływu propolisu na jakość fizyko-chemiczną i walory sensoryczne żywności oraz potencjalne działanie

alergiczne. Paragraf 7 tego artykułu „Legal regulations for propolis use in food”, opisujący aktualny stan prawny i dozwolone zastosowania propolisu w produktach spożywczych w różnych regionach świata, wskazuje na wyjątkową staranność w ocenie możliwości komercjalizacji zastosowania ekstraktów propolisu w żywności. Przedstawiony w publikacji A1 aktualny stan wiedzy w obrębie tematu pracy doktorskiej świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym Pani mgr Katarzyny Pobiega i świadomym podjęciu tematu badawczego z jasno wytyczonym celem aplikacyjnym.

Hipoteza badawcza została sformułowana jasno, precyzyjnie definiując tezy pracy doktorskiej, oparte na związku przyczynowo skutkowym pomiędzy zastosowaniem jadalnych powłok pullulanowo-propolisowych na powierzchni surowców roślinnych i zachowaniem walorów fizyko-chemicznych i sensorycznych owoców i warzyw oraz ich ochroną przeciwdrobnoustrojową. Konsekwentna realizacja logicznie zdefiniowanych celów szczegółowych pracy doprowadziła do jednoznacznej weryfikacji założonej hipotezy. Z obowiązku recenzenta zwracam tylko uwagę na nieprecyzyjne sformułowanie trzeciego w kolejności celu pracy na s. 27: "Badanie wpływu aktywności przeciwdrobnoustrojowej filmu pullulanowego z dodatkiem ekstraktu propolisu", gdzie warto doprecyzować kierunek badań przeciwdrobnoustrojowych.

Kluczowym dla badań jest wybór źródła propolisu oraz metody otrzymywania ekstraktu propolisu dedykowanego do wytwarzania powłoki jadalnej. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres doboru próbek propolisu, 7 próbek pochodzących z sześciu różnych województw pasa od północno-wschodnich do południowych obszarów Polski poprzez region centralnej Polski (małopolskiego, mazowieckiego, łódzkiego, podlaskiego, warmińsko-mazurskiego i kujawsko-pomorskiego). Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Katarzyny Pobiega jest nowatorska i stanowi pierwszą próbę zastosowania ekstraktu propolisu w technologii żywności. Dotychczasowe prace polskich badaczy traktują jedynie o medycznym i farmaceutycznym wykorzystaniu propolisu. Studia nad doбором metody ekstrakcji propolisu w celu pozyskania substancji o wysokiej aktywności biologicznej przedstawiono w publikacji A2:

- **A2:** Pobiega K., Kraśniewska K., Derewiaka D., Gniewosz M. 2019. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 5386-5395.

Dobór optymalnej metody ekstrakcji przeprowadzono z wykorzystaniem propolisu pochodzącego z powiatu ostrowieckiego, oceniając skład chemiczny, zawartość fenoli

i flawonoidów oraz aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec zestawu wybranych drobnoustrojów należących do sześciu gatunków. Ekstrakcję prowadzono w 12 wariantach, ze zmiennym czasem wytrząsania, stosunkiem propolisu do etanolu oraz czasem sonikacji. Połączenie techniki ekstrakcji wytrząsanej i ekstrakcji ultradźwiękowej doprowadziło do uzyskania ekstraktów o zadowalających właściwościach biologicznych. Kolejnym krokiem podjętym przez Doktorantkę była weryfikacja aktywności przeciwdrobnoustrojowej sześciu ekstraktów propolisu z innych rejonów Polski otrzymanych w optymalnych warunkach ekstrakcji. Badania te zostały zawarte w publikacjach A3 i A4:

- **A3:** Pobiega K., Kraśniewska K., Przybył J.L., Bączek K., Żubernik J., Witrowa-Rajchert D., Gniewosz M. 2019. Growth biocontrol of foodborne pathogens and spoilage microorganisms of food by polish propolis extracts. *Molecules*, 24, 2965
- **A4:** Pobiega K., Przybył J.L., Żubernik J., Gniewosz M. 2020. Prolonging the shelf life of cherry tomatoes by pullulan coating with ethanol extract of propolis during refrigerated storage. *Food and Bioprocess Technology*, 13, 1447-1461.

Walorem części pracy opisanej w tych trzech publikacjach (A2, A3 i A4) jest nie tylko wyłonienie ekstraktu o najwyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ale przede wszystkim charakterystyka składu jakościowego i ilościowego ekstraktów polskich propolisów, w których po raz pierwszy zidentyfikowano: katechinę, apinę, oroxylinę A oraz kwas cykoriowy, wanilinowy i syringowy. Jest to niewątpliwie wkład w rozwój polskiej apidologii. Należy również podkreślić rozległość badań przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów propolisów, w których użyto zestawu bakterii, drożdży i pleśni testowych zawierających aż 27 szczepów drobnoustrojów należących do 24 gatunków. W większości są to gatunki patogenne stanowiące zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka oraz pleśnie środowiskowe typowe dla środowiska roślinnego. Aktywność przeciwdrobnoustrojową oceniano zarówno na podstawie wartości MIC i MBC/MFC poszczególnych ekstraktów, ale również poprzez określenie dynamiki zamierania populacji (*time-kill curves*) dla wybranych drobnoustrojów. Ekstrakty z polskich propolisów pochodzące z różnych regionów kraju różniły się aktywnością przeciwdrobnoustrojową, ale wszystkie wykazywały wysoką aktywność wobec testowanych szczepów bakterii i niższą wobec grzybów (zmiany liczebności populacji odpowiednio po 2 i 24 godzinach kontaktu z komórkami drobnoustrojów). Ta ocena umożliwiła celowy wybór ekstraktu z propolisu pozyskanego z pasieki w powiecie toruńskim, województwie kujawsko-pomorskim (EE7), jako dedykowanego dla powłoki pullulanowo-propolisowej. O staranności Doktorantki w eksperymentalnej weryfikacji założeń pracy świadczy również fakt uzupełnienia

zestawienia zakresu aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów w Tabeli 5 (s. 42) komentarza polskojęzycznego o dane nie zamieszczone w publikacjach A3 i A4.

Próby aplikacji powłok pullulanowo-propolisowych na powierzchnie surowców roślinnych zostały poprzedzone weryfikacją przeciwdrobnoustrojowej aktywności powłok pullulanowych z dodatkiem 5 lub 10% ekstraktu propolisu EEP7 wobec patogennych bakterii przenoszonych przez żywność *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, i *Salmonella* Typhimurium oraz pleśni powodujących choroby roślin i typowych dla środowiska roślinnego *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum* i *Botrytis cinerea*. Etap ten opisany w publikacji A4 został dobrze zaplanowany i stanowi ostatni element badań podstawowych przed kontrolą w warunkach *in situ*. W mojej opinii, wytworzony w tej części badań film pullulanowo-propolisowy można byłoby dodatkowo ocenić pod kątem własności reologicznych, co stanowiłoby ewentualne przesłanki do wykorzystania tego układu nie tylko w formie powłok, ale również filmów przeznaczonych dla innego rodzaju produktów spożywczych, np. przetworów mięsnych. Rozumiem jednak, że prezentowane przez Doktorantkę badania były ukierunkowane na przedłużenie trwałości owoców i warzyw poprzez nanoszenie filmów na ich powierzchnię.

Ostatni etap pracy przynosi weryfikację hipotezy badawczej zakładającej, że powleczenie surowców roślinnych powłoką pullulanowo-propolisową umożliwi przedłużenie ich trwałości mikrobiologicznej i nie niesie niekorzystnych zmian surowca. Tu również Pani mgr Katarzyna Pobiega konsekwentnie dokonuje oceny trwałości mikrobiologicznej oraz cech fizyko-chemicznych i sensorycznych dwóch wybranych surowców roślinnych: pomidorów koktajlowych (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) oraz borówek amerykańskich (*Vaccinium corymbosum*). Badania te zostały zawarte w uprzednio wymienionej publikacji A4 oraz publikacji A5:

- **A5:** Pobiega K., Igielska M., Włodarczyk P., Gniewosz M. 2021. The use of pullulan coatings with propolis extract to extend the shelf life of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. *International Journal of Food Science and Technology*, 56, 1013-1020.

Surowiec do badań został dobrany właściwie, zarówno pomidory koktajlowe, jak i borówka amerykańska charakteryzują się stosunkowo niską trwałością i tracą walory sensoryczne przy długim czasie ich przechowania. Ponadto, surowce te cieszą się dużą popularnością wśród konsumentów, co skutkuje również wzrostem podaży i często koniecznością wydłużenia czasu w drodze od producenta do konsumenta. Czas przechowania surowców (21 dni) oraz oceniane parametry fizyko-chemiczne zostały właściwie dobrane, pozwalając

na wiarygodną ocenę jakości surowców pokrytych filmem pullulanowo-propolisowym. Trwałość mikrobiologiczną obu surowców oceniono po inokulacji bakteriami *Salmonella Typhimurium/Salmonella Enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* i konidiami pleśni *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, podobnie jak w badaniach powłok pullulanowo-propolisowych *in vitro*, a borówki dodatkowo jeszcze *Colletotrichum gloeosporoides*. Doktorantka szczegółowo uzasadnia wybór poszczególnych parametrów oceny przechowanego surowca, co świadczy o ich świadomym wyborze opartym na znajomości zagadnień przechowalniczych. Stwierdzenie korzystnego efektu pokrycia powierzchni obu stosowanych w badaniach surowców zaprojektowaną powłoką pullulanowo-propolisową poprzez opóźnienie ich dojrzewania oraz z zachowaniem cech fizykochemicznych jest dobrym prognostykiem na wykorzystanie tych powłok w skali przemysłowej. Udowodnione działanie przeciwdrobnoustrojowe powłoki pullulanowej wzbogacanej 5 lub 10% dodatkiem etanolowego ekstraktu propolisu wobec groźnych patogenów przenoszonych z żywnością oraz fitopatogenów zwiększa ich potencjał komercjalizacyjny. Optymizmem napawa również ocena organoleptyczna przeprowadzona na próbce pomidorów koktajlowych pokrytych filmem pullulanowo-propolisowym. Powłoka ta nie tylko nie wpłynęła negatywnie na walory sensoryczne pomidorów, ale dodatkowo zwiększała ich połysk i atrakcyjność w odbiorze konsumentów.

Komentarz do publikacji zawiera 139 pozycji bibliografii, w większości pokrywających się z pozycjami literaturowymi cytowanymi w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Przyniesione piśmiennictwo jest ilustracją aktualnego stanu wiedzy oraz dokumentacją postępu w obszarze tematycznym pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Pobiegi. Publikacje z lat 2015-2021 stanowią 67% bibliografii, co wskazuje na bardzo dobrą znajomość aktualnej literatury problemu.

Uwagi edytorskie

Recenzent, pomimo starań, nie znajduje istotnych usterek edytorskich, zarówno w komentarzu do publikacji, jak i całości pracy. Rozprawa doktorska została edycyjnie bardzo starannie przygotowana, z wręcz doskonałą korektą.

Konkluzje recenzji

Podsumowując, stwierdzam że postawiona hipoteza badawcza została pozytywnie zweryfikowana, a wszystkie sformułowane cele szczegółowe zostały w pełni zrealizowane. Praca istotnie poszerza stan wiedzy w dyscyplinie Technologii żywności i żywienia, szczególnie w obszarze wiedzy o potencjale przeciwdrobnoustrojowym etanolowych ekstraktów propolisów i ich zastosowań w technologii żywności. Ponadto, wykrycie związków dotychczas nienotowanych w profilu chemicznym ekstraktów z polskich propolisów stanowi niewątpliwą wkład w rozwój polskiej apidologii. Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Pobiegi ma również cenny aspekt aplikacyjny, po raz pierwszy wykazując celowość zastosowania powłok pullulanowo-propolisowych do przedłużenia trwałości surowców roślinnych.

Stwierdzam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa Pani mgr inż. Katarzyny Pobiegi spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawarte w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Technologia żywności i żywienia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Pobiegi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na kompleksowe podejście do postawionej hipotezy badawczej oraz znaczący wkład w rozwój dyscypliny Technologia żywności i żywienia, rozprawę doktorską mgr inż. Katarzyny Pobiegi oceniam jako wyróżniającą się. Wniosek o wyróżnienie wraz z jego szczegółowym uzasadnieniem przedstawiam w osobnym piśmie.

Arkadiusz - Szpęgulec