

Lublin 02.01.2023

prof. dr hab. Waldemar Gustaw

Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego i Gastronomii

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Joanny Bucka - Kolendo

pt.

„Wpływ wysokiego ciśnienia, jako czynnika stresowego, na zmiany zachodzące w polimorfizmie genetycznym i proteomie bakterii fermentacji mlekowej”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Barbary Sokołowskiej prof. IBPRS oraz dr inż. Anny Otlewskiej z Politechniki Łódzkiej jako promotora pomocniczego

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest cyklem pięciu publikacji, z których jedna publikacja jest przeglądowna a pozostałe pracami oryginalnymi. Prace zostały opublikowane w latach 2017-2022 w następujących czasopismach: *Acta Biochimica Polonica*, , *Microorganisms*, *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, *Genes*, *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. Wszystkie czasopisma w których opublikowano prace są przypisane według listy MEiN do dyscypliny technologia żywności i żywienia. Zgodnie z punktacją Ministerstwa Edukacji i Nauki poszczególne publikację miały następującą wagę punktową P1- 15 pkt.; P2 -20 pkt., P3 -20 pkt., P4 – 100 pkt. i P5 -40 pkt.. Sumaryczna wartość punktowa osiągnięcia to 195 pkt. a łączny współczynnik wpływu zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 11,18. Na tej podstawie można stwierdzić, że oceniane osiągnięcie zostało opublikowane w cenionych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Wszystkie oceniane publikacje powstały przy udziale Pani Promotor a w dwóch publikacjach autorów było trzech. Udziały Doktorantki w poszczególnych publikacjach zgodnie z załączonymi oświadczeniami były bardzo duże i wynosiły od 80 do 90%. Dodatkowo

we wszystkich publikacjach Pani mgr inż. Joanna Bucka – Kolendo była autorem korespondencyjnym co potwierdza wiodącą rolę doktorantki w ocenianych publikacjach.

Całość rozprawy to 124 stronicowe opracowanie, część pierwsza składa się z 51 stron i stanowi wstęp teoretyczny oraz skrócony opis uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Oceniana praca doktorska dodatkowo, poza załączonymi kopiami publikacji, zawiera następujące rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Przegląd piśmiennictwa, Hipotezy i cel pracy, Zakres prac, Omówienie osiągnięć badawczych przedstawionych do oceny, Realizacja celów, weryfikacja hipotez i wnioski, Bibliografia oraz Dorobek naukowy Doktorantki.

Dobór i znaczenie tematyki

Technologia wysokich ciśnień jest coraz częściej stosowana na skalę przemysłową w celu przedłużenia trwałości żywności na skutek redukcji liczby drobnoustrojów czy aktywności enzymów. Metoda ta wykorzystywana jest m.in. w przemyśle owocowo-warzywnym, mleczarskim oraz mięsny. Jest to nietermiczna metoda utrwalania żywności, przez co wzbudza coraz większe zainteresowanie zarówno ze strony producentów jak i konsumentów poszukujących bezpiecznej żywności o jak najmniej zmienionym składzie na skutek zastosowanych procesów przetwórczych. Wysokie ciśnienie hydrostatyczne zmniejsza liczbę drobnoustrojów w produktach spożywczych. Decydujące znaczenie w tym procesie mają zmiany morfologiczne komórek, tj. ich deformacja i zmiana struktury błony komórkowej, zmiany w jądrze komórkowym oraz aktywności enzymów komórkowych. Takie zmiany mogą powodować trudności w prawidłowej identyfikacji bakterii, które przeżyły obróbkę HHP. Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) są powszechnie spotykane w żywności a wpływ obróbki HHP na LAB nie został w pełni poznany. Zawarte w recenzowanej rozprawie doktorskiej badania są aktualne, ciekawe jak również mogą mieć zastosowanie aplikacyjne.

Ocena merytoryczna pracy

W pierwszej części pracy tj. w rozdziale zatytułowanym „Przegląd piśmiennictwa” Doktorantka opisała bakterie fermentacji mlekowej. Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) są nieszkodliwymi lub celowo stosowanymi drobnoustrojami w wielu produktach spożywczych, w innych mogą przyczyniać się do ich zepsucia, co szczególnie może być widoczne w sokach i napojach. LAB są odporne na wiele czynników stresowych, co daje im zdolność przetrwania w

trudnych warunkach jakie mają miejsce np. podczas konserwowania żywności. Następnie przedstawiła metody utrwalania żywności i wpływ na LAB zastosowanej obróbki z zastosowaniem wysokich ciśnień. W kolejnym podrozdziale opisała metody identyfikacji LAB, a w następnym fizjologię odpowiedzi LAB na stres. Poruszane w tej części pracy zagadnienia są poprawnie dobrane i dobrze uzasadniają podjętą tematykę badawczą.

W pierwszej części pracy, do której zaliczam wszystkie rozdziały poza załączonymi publikacjami, znalazły się drobne niedociągnięcia jak np.:

- brak zaznaczonych przez wcięcie, akapitów,
- brak staranności w tekście w postaci np. niepotrzebnych dodatkowych odstępów pomiędzy wyrazami,
- „przeżywalność u gospodarza” – przeżywalność w organizmie gospodarza – str. 13
- początek zdania „ w naturalny sposób....” napisany małą literą str. 13,
- „Klasy I i Klasy III” str. 25

Przystępując do części badawczej pracy doktorskiej Doktorantka postawiła następujące hipotezy badawcze:

1. „Wysokie ciśnienie hydrostatyczne wpływa na zmiany profili widm mas białek LAB, co może prowadzić do zróżnicowanej identyfikacji metodą MALDI-TOF MS”
2. „Wysokie ciśnienie hydrostatyczne indukuje rozregulowanie procesów biologicznych w LAB, co wiąże się ze zmianą profilu ekspresji genów uczestniczących w odpowiedzi na stres”
3. „ Poznanie mechanizmów odpowiedzi na stres u LAB umożliwi ich lepszą selekcję przy wyborze do zastosowań w przemyśle spożywczym”.

W celu weryfikacji postawionych hipotez, Doktorantka sformułowała główny cel badawczy – którym było ustalenie czy wywołane przez zastosowanie HHP zmiany na poziomie genetycznym i proteomicznym w bakterii kwasu mlekowego, wiążą się z trudnościami w prawidłowej identyfikacji bakterii. Cel główny pracy doktorskiej został rozwinięty w czterech celach szczegółowych. Mam pewne wątpliwości co do celu pierwszego, który tak naprawdę dotyczył nie określenia a zebrania aktualnej wiedzy na temat molekularnych mechanizmów związanych z odpowiedzią na stres bakterii LAB. W opinii recenzenta hipotezy jak, cel główny oraz pozostałe cele szczegółowe zostały prawidłowo sformułowane.

W rozdziale „Zakres prac” Doktorantka opisała w jaki sposób realizowała poszczególne cele szczegółowe, jaki materiał został użyty w badaniach i jakimi metodami był on badany. W części badawczej pracy doktorskiej wykorzystano łącznie 15 szczepów bakterii fermentacji

mlekowej, które wyizolowano z takich produktów jak: piwo, sok pomidorowy, sok z kiszonych ogórków, chleb, lody i probiotyk. Badane szczepy scharakteryzowano na podstawie sekwencji nukleotydowej genu kodującego podjednostkę 16S rDNA.

Zastosowanie modeli graficznych ilustrujących metodykę badań, wpłynęło na uatrakcyjnianie tej części pracy jak również ułatwiło zrozumienie zakresu badań przeprowadzonych przez Doktorantkę. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka wykorzystwała w trakcie wykonywania pracy doktorskiej szerokie spektrum nowoczesnych metod badawczych, zarówno analitycznych jak i narzędzi informatycznych.

W rozdziale „Omówienie osiągnięć badawczych przedstawionych do oceny” Doktorantka w sposób syntetyczny opisała uzyskane wyniki, podkreśliła najciekawsze z nich, wskazując w której publikacji zostały one szerzej opisane. Szczegółowe omówienie rezultatów wraz z dyskusją wyników czytelnik może znaleźć w załączonych publikacjach.

W publikacji P1 Doktorantka zebrała informacje o najczęstszych czynnikach stresowych, na które LAB są narażone tj. wysoka i niska temperatura, kwasowość, obecność NaCl oraz obróbka HHP. W warunkach stresowych LAB uruchamiają mechanizmy pozwalające im dostosować się do zmian w środowisku, co może wpłynąć na ich żywotność i właściwości technologiczne. Doktorantka na podstawie dostępnej literatury scharakteryzowała genetyczne podstawy odpowiedzi LAB, na różnego rodzaju stres, które mają miejsce w procesach adaptacyjnych komórek bakterii. Przygotowanie pracy przeglądowej na wstępnym etapie przygotowań do realizacji pracy doktorskiej było niewątpliwie trudne jednak zakończyło się sukcesem o czym świadczy duża liczba cytowań tej publikacji.

Kolejne publikacje wchodzące w skład ocenianej pracy stanowiły jej część badawczą.

W publikacji pt. „Influence of High Hydrostatic Pressure on the Identification of *Lactobacillus* by MALDI-TOF MS- Preliminary Study” opublikowanej w czasopiśmie *Microorganisms* (Publikacja 2), określano jak zastosowana metoda HHP wpływa na profil widm mas białek badanych szczepów LAB. Doktorantka badała również wpływ tych zmian na możliwość identyfikacji bakterii przy zastosowaniu metody MALDI-TOF MS, która jest powszechnie wykorzystywana do oznaczania rodzaju, gatunku jak również szczepu badanych mikroorganizmów. W omawianej publikacji przebadano 13 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pozyskanych z różnych produktów spożywczych, które poddano działaniu HPP. W przypadku trzech badanych szczepów LAB stwierdzono różnice pomiędzy widmem kontrolnym a widmem uzyskanym dla szczepów poddanych stresowi związanemu z obróbką

HHP. Otrzymane w tej publikacji wyniki potwierdziły, że zastosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych może wpływać na zmiany w proteomie bakterii LAB, co może prowadzić do powstania różnych profili widm mas białek w MALDI -TOF MS. Tym samym Doktorantka pozytywnie zrealizowała drugi cel szczegółowy.

W Publikacji 3 Doktorantka dokonała porównania metod identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej. Najczęściej stosowane do identyfikacji gatunków bakterii LAB są metody oparte na genomice takie jak np. 16S rDNA, pheS i proteomice jak np. MALDI-TOF. Doktorantka w omawianej publikacji przebadła 12 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności. W zawiązku z różną liczbą szczepów badanych w poszczególnych publikacjach wchodzących w skład pracy doktorskiej, nasuwa się pytanie na podstawie jakich kryteriów Doktorantka zdecydowała o wyborze szczepów bakterii do poszczególnych badań? W omawianej publikacji podczas analizy sekwencji pheS dowiedziono, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mają duże pokrewieństwo tego genu, co może wskazywać na niewielkie możliwości jego zastosowania jako wiarygodnego i czułego narzędzia do różnicowania. Dużo większe możliwości uwidocznienie różnorodności badanych szczepów, wśród metod molekularnych, wykazała analiza genu 16S rDNA. Badania jakie Doktorantka wykonała przy zastosowaniu metody MALDI-TOF MS wykazały jej duże możliwości dyskryminacyjne, jednak możliwości tej metody w dużej mierze zależały od zasobów biblioteki referencyjnych widm masowych. Otrzymane wyniki pozwoliły Doktorantce zrealizować trzeci cel szczegółowy.

Kolejna publikacja wchodząca w skład pracy doktorskiej dotyczyła wpływu obróbki HHP na ekspresję genów *dnaK*, *hrcA* i *ctsR*. W tej publikacji Doktorantka wykorzystowała wszystkie 15 szczepów bakterii LAB jakie wykorzystywała w całej pracy doktorskiej. Do badań zmian ekspresji genów wykorzystano analizę qRT-PCR z wykorzystaniem specyficznych dla poszczególnych genów sond i primerów. Wpływ zastosowanej obróbki HHP dał niejednoznaczne wyniki. W przypadku części szczepów, wszystkie trzy badane geny charakteryzowały się większą ekspresją a u innych badanych szczepów bakterii LAB zaobserwowano odmienną zależność. Na tej podstawie Doktorantka stwierdziła, że badane szczepy *Lactobacillus* charakteryzowały się bardzo zróżnicowaną ekspresją kontrolowanych genów związaną z zastosowanym czynnikiem stresogennym. W celu opisanego skomplikowanego mechanizmu odpowiedzi na czynniki stresogenne, Doktorantka zastosowała zaawansowane narzędzia informatyczne i opracowała sieć Protein-Protein

Interaction. Narzędzie to pozwoliło wyszukać potencjalne interakcje między genami o zróżnicowanej ekspresji u różnych bakterii LAB.

Publikacja 5 dotyczyła porównania wpływu HHP na zmiany sekwencji genów *dnaK*, *hrcA* i *ctsR*, jako wynik ekspresji tych genów na skutek działania czynnika stresu. W publikacji tej Doktorantka przebadła pięć wybranych szczepów. Doktorantka nie stwierdziła znaczących różnic pomiędzy sekwencjami dla wszystkich badanych genów pochodzących ze szczepów kontrolnych oraz poddanych obróbce HHP.

Podczas studiowania tej części pracy doktorskiej nasuwają się następujące pytania:

Jakie jest zdanie Doktorantki na temat nowej nomenklatury bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, która była stosowana w niektórych publikacjach wchodzących w skład ocenianej pracy?

Jak dobrano parametry obróbki wysokimi ciśnieniami badanych układów?

W końcowym fragmencie I części rozprawy Doktorantka przedstawiła rozdział zatytułowany „Realizacja celów, weryfikacja hipotez i wnioski”. Opisała jak zrealizowała poszczególne cele w publikacjach stanowiących ocenianą pracę doktorską jak również porównała swoje wyniki z doniesieniami uzyskanymi przez innych naukowców. Podsumowaniem tego rozdziału są wnioski. Doktorantka sformułowała 6 wniosków stanowiących odpowiedź na postawione w hipotezy badawcze. Przedstawione wnioski uwypuklają najważniejsze wyniki uzyskane w pracy.

Rozdział Bibliografia to poprawnie przygotowany spis literatury, obejmujący 90 pozycji. W zdecydowanej większości cytowane prace to artykuły anglojęzyczne z ostatnich lat, bezpośrednio powiązane z tematyką pracy doktorskiej.

Podsumowanie

Oceniając merytorycznie przedłożoną do recenzji pracę doktorską mgr inż. Joanny Bucka – Kolendo, stwierdzam, że Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością podjętej tematyki badań. W sposób przemyślany zaplanowała i wykonała doświadczenia, wykazując się umiejętnością posługiwania szerokim spektrum aparatury badawczej, uzyskując wartościowe wyniki. Otrzymane przez mgr inż. Joanny Bucka – Kolendo wyniki mają zdecydowanie cechy nowości naukowej i mogą być wykorzystane praktyczne. Wymienione w recenzji drobne uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej, a jedynie wskazują niedociągnięcia, które Doktorantka może wykorzystać w przyszłości. Uważam, że będąca

przedmiotem oceny rozprawa Pani mgr inż. Joanny Bucka – Kolendo pt. „Wpływ wysokiego ciśnienia, jako czynnika stresowego, na zmiany zachodzące w polimorfizmie genetycznym i proteomie bakterii fermentacji mlekowej”, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.). Dlatego wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno -Spożywczego im prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie.


prof. dr hab. Waldemar Gustaw