

Gdynia, 07.02.2017

Prof. dr hab. Izabela Steinka  
Katedra Towaroznawstwa i Zarządzania Jakością  
Akademia Morska w Gdyni

### Recenzja

Rozprawy doktorskiej  
mgr inż. Izabeli Porębskiej

pt. ”Molekularna analiza mechanizmów i badanie dynamiki procesów kiełkowania  
przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem wybranych czynników  
aktywujących”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Łucji Łaniewskiej –Trokenheim oraz promotora  
pomocniczego dr hab. inż. Barbary Sokołowskiej

Podstawa formalna recenzji: pismo dotyczące Uchwały Rady Wydziału UWM z dn.  
8.12.2016. Podstawa prawna art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach i  
tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami)

Systemy zarządzania jakością powodują, że producenci żywności skupiają się w znacznej mierze na ograniczaniu rozwoju mikroorganizmów stanowiących ryzyko w rozumieniu ustawy o bezpieczeństwie żywności. Mniejsza uwaga poświęcana jest ocenie obecności drobnoustrojów, które nie stanowią zagrożenia higienicznego. Do takich zaliczyć należy bakterie *Alicyclobacillus acidophilus*, *Alicyclobacillus contaminans* czy *Alicyclobacillus acidoterrestris*, których obecność w sokach owocowych potwierdzają dane zawarte w publikacjach naukowych. Autorzy publikacji zwracają uwagę na zdolność tych mikroorganizmów do fermentowania kilkadziesiątu substancji sacharydowych i alkoholi, stanowiących nierzadko substraty do produkcji związków niekorzystnych z punktu widzenia organoleptyki.

Uwaga badaczy skupiona jest przede wszystkim na ocenie ciepłooporności form przetrwanych, które wytwarzane są przez te bakterie, bez względu na rodzaj surowca roślinnego stosowanego do produkcji napojów.

Badania podejmowane przez różne ośrodki wskazują, że to przede wszystkim soki jabłkowe, grejpfrutowe i pomarańczowe stanowią podłoża, z których izolowane szczepy *Alicyclobacillus acidoterrestris* charakteryzuje znaczna oporność termiczna przetrwalników. Wartości temperatur określające poziom tej ciepłooporności wahają się od 95°C do 97°C przy pH 3,3-4,1. Z danych piśmiennictwa wynika, że w przy tych parametrach czas redukcji dziesiętnej wyznaczony dla *Alicyclobacillus acidoterrestris* dwukrotnie przekracza stosowany w praktyce czas procesu pasteryzacji napojów owocowych.

Pozostawanie przetrwalnikujących szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* w przechowywanych sokach owocowych stanowi zjawisko mogące również budzić uzasadniony niepokój z uwagi na produkcję nieakceptowanych przez konsumentów związków takich, jak 2-metoksyfenol, 2,6-dibromofenol czy 2,6-dichlorofenol. Obecność i kiełkowanie przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w czasie przechowywania soków stanowi znaczny problem technologiczny. Biorąc pod uwagę, że w ponad 40% krajowych soków stwierdzano obecność tych bakterii, podjęcie przez Doktorantkę tematu związanego z oceną możliwości kiełkowania i inaktywacji przetrwalników w sokach jabłkowych wydaje się wysoce zasadne.

#### **Charakterystyka formalnej strony pracy**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest cyklem publikacji powiązanych tematycznie. W skład rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Molekularna analiza mechanizmów i badanie dynamiki procesów kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem wybranych czynników aktywujących” wchodzi opracowanie zawierające wstęp, omówienie wyników badań, wnioski i podsumowanie oraz dziewięć publikacji. Wstęp zawarty w opracowaniu przedłożonym przez Doktorantkę stanowi przegląd piśmiennictwa dotyczącego przedmiotu badań. W tej części rozprawy przedstawiono hipotezę oraz cel badań i cele szczegółowe. Przegląd literatury przedmiotu zaprezentowano w oparciu o 49 pozycji z czego 71% pochodzi z ostatnich dziesięciu lat. Publikacje stanowiące pozostałą część dokumentującą wyniki badań Doktorantki zamieszczono są w 5 anglojęzycznych czasopismach takich jak *High Pressure Research*, *Nutrition&Food Sciences*, *Polish Journal of Natural Sciences*, *Polish Journal of Microbiology*, *Food Control.*, *Acta Biochimica*

*Polonica*. Pozostałe publikacje zawarto w kwartalniku *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* oraz *Postęпах Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*,

Trzy z tych publikacji: "The germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores and release dipicolinic acid under supercritical carbon dioxide", "Dipicolinic acid release and germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under nutrient germinants" oraz "Analysis of germination proteins in *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores subjected to external factors" posiadają deklaracje wydawców o przyjęciu do druku i zamieszczeniu w czasopiśmie, nie później niż w pierwszych numerach 2017 roku.

W przedłożonych publikacjach wykorzystano, nie powtarzając się w kolejnych artykułach, 132 pozycje anglojęzycznego piśmiennictwa z ostatnich 10 lat.

Deklarowany udział Doktorantki w procesie tworzenia poszczególnych publikacji wynosił od 65% do 80%. Jej wkład w powstawanie kolejnych artykułów obejmował planowanie i nadzorowanie wykonywania doświadczeń, analizę i interpretację wyników oraz ich dyskusję w oparciu o uprzednie studia literatury przedmiotu, a następnie przygotowanie manuskryptu. Taki podział prac w tworzeniu przedłożonych publikacji był zgodny z dołączonymi do rozprawy oświadczeniami współautorów.

Publikacje, uwzględniając wartości współczynników Impact Factor osiągnęły w sumie wartość 7,365. Ocena wartości naukowej tych publikacji w skali MNiSW w przeliczeniu na udziały Doktorantki w poszczególnych artykułach, odpowiada 94,4 punktom.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że wszystkie publikacje powstawały w ramach badań objętych projektem badawczym IBPRS, którego kierownictwo było udziałem mgr Porębskiej.

#### **Merytoryczna ocena rozprawy**

Za cel rozprawy Doktorantka postawiła cytując: „udowodnienie hipotezy, że stres fizyczny związany ze stosowaniem innowacyjnych technik utrwalania żywności o potencjale aplikacyjnym m.in. wysokich ciśnień i ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym oraz dostępność wybranych substancji biochemicznych inicjują i wpływają na przebieg procesu kiełkowania i inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* „

W mojej opinii to, co Doktorantka uważa za hipotezę, jest tezą tej rozprawy. Szkoda, że w tym miejscu nie sformułowano hipotez.

Niezależnie od powyższego, tak postawiony cel pracy wykazywał zgodność z zadaniami badawczymi, które obejmowały:

- badanie wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na kiełkowanie przetrwalników wysoce termoopornego szczepu *Alicyclobacillus acidoterrestris* w odtworzonym soku jabłkowym,

- ocenę przydatności metody pomiaru gęstości optycznej w analizie dynamiki kiełkowania przetrwalników tego szczepu pobudzanego za pomocą ciśnieniowania (HHP) w zmiennych warunkach temperatury, pH i podłoża,
- analizę przebiegu procesu kiełkowania oraz stopnia inaktywacji dwóch szczepów o zróżnicowanej ciepłooporności przetrwalników, zainicjowanego przez ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym,
- porównanie wpływu działania ditlenku w stanie nadkrytycznym i HHP na kiełkowanie i inaktywację przetrwalników dwóch szczepów zawieszonych w sokach o różnym stężeniu koncentratu,
- ocenę wpływu parametrów obu metod na wydzielanie kwasu dipikolinowego podczas kiełkowania przetrwalników,
- badanie dynamiki kiełkowania w obecności aminokwasu L-alaniny,
- obserwację oddziaływania czynników o charakterze fizycznym i chemicznym na pobudzanie kiełkowania i poziom białek towarzyszących temu procesowi.

Analiza założonych celów badawczych pozwala na stwierdzenie, że badania stanowiły jednolitą całość dobrze zaplanowanego doświadczenia.

#### **Metodyka badań**

Do realizacji przyjętych zadań badawczych Doktorantka wybrała dwa pozyskane z krajowych soków szczepy *Alicyclobacillus acidoterrestris* o znanej i różnej wrażliwości termicznej przetrwalników tj. szczep TO-117/02 i TO-169/06. Badania prowadzono w warunkach modelowych na buforze oraz w soku jabłkowym o różnym stężeniu koncentratu.

Ocenę stopnia kiełkowania i inaktywacji przetrwalników oparła Autorka na pomiarze gęstości optycznej za pomocą spektrofotometrii równoległe korzystając z oznaczeń tradycyjną metodą hodowlaną. W dalszych badaniach posłużono się nowoczesnymi metodami badawczymi. Zastosowano chromatografię HPLC w celu oceny stężenia uwalnianego kwasu dipikolinowego. Ciśnieniowanie próbek prowadzono w komorze wysokociśnieniowej U4000/65. Do oznaczenia białek towarzyszących procesom kiełkowania przetrwalników Doktorantka zastosowała elektroforezę żelową SDS-PAGE na żelu poliakrylamidowym.

Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej, a optymalizacji danych dokonano w oparciu o uznane narzędzia statystyczne m.in. analizę wariacji, test wielokrotnych porównań Duncana i regresję liniową.

### Ocena merytoryczna

Badanie wpływu czynników fizycznych na proces kiełkowania pozwoliło mgr Porębskiej na ustalenie, że stosowanie ciśnienia 400- 500 MPa w czasie 15 minut i inkubacja po ciśnieniowaniu w temperaturze 45<sup>0</sup> C daje możliwość obserwacji istotnego momentu w zachowaniu i dynamice procesu kiełkowania przetrwalników szczepu *Alicyclobacillus acidoterrestris* o wysokiej ciepłooporności. Zmiany zachodzące w procesie przechodzenia spor w komórki wegetatywne dobrze odzwierciedlały uzyskane przez Doktorantkę wyniki pomiaru gęstości optycznej wskazujące początek kolejnej fazy wzrostu wyrastania. Autorka potwierdziła obserwowaną przez innych badaczy przydatność metody pomiaru gęstości optycznej do badań fizjologii procesu kiełkowania także w przypadku szczepu *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Mgr Porębska udowodniła również, że wzrost wartości pH zmniejsza zdolność kiełkowania przetrwalników i znacząco wpływa na stopień ich inaktywacji w przypadku stosowania wysokich ciśnień hydrostatycznych (HHP).

Dynamika procesu kiełkowania przetrwalników podczas stosowania ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym (SCCD) uzależniona była od ciepłooporności szczepu i wysokości stosowanej temperatury. W tej części badań Doktorantka wykazała różnicę we wrażliwości na stosowany czynnik w zależności od tego czy badania prowadzono stosując sok jabłkowy czy były prowadzone w warunkach modelowych na buforze.

Rezultaty badań pozwoliły mgr Porębskiej wykazać, że efektywność oddziaływania HHP i SCCD jako czynników inicjujących kiełkowanie i inaktywujących było uzależnione nie tylko od wysokości temperatury ale przede wszystkim od czasu jej działania.

Doktorantce udało się udowodnić, że wzrost czasu działania HHP w temperaturze 50<sup>0</sup>C o 10 minut, dla procesu prowadzonego w soku o niskim stężeniu koncentratu, powodował zwiększenie inaktywacji przetrwalników bardziej wrażliwego szczepu o 59%. Mgr Porębska wykazała, że podwyższenie temperatury w obydwu stosowanych metodach o 25<sup>0</sup>C było odpowiedzialne za uzyskanie maksymalnych wielkości inaktywowanych form wegetatywnych powstających w wyniku kiełkowania. Jednocześnie obserwowała zróżnicowany wpływ stężenia koncentratu w sokach na kiełkowanie i inaktywację w zależności od ciepłooporności testowanego szczepu.

Podczas badań Doktorantka potwierdziła rezultaty uzyskane przez innych autorów odnośnie efektów działania HHP i udowodniła, że utrwalanie soków za pomocą SCCD i HHP może powodować redukcję nawet o 3 log jtk/ml ale jest to zależne od stężenia koncentratu w soku i temperatury w jakiej prowadzony jest proces.

W mojej opinii jest to ważna część pracy, w której mgr Porębskiej udało się wykazać, że wartość krytycznego parametru jakim jest temperatura w przypadku stosowania alternatywnych metod utrwalania może być znacznie niższa niż obecnie stosowana w przemysłowej produkcji soków, a także zróżnicowaną przydatność każdej z testowanych metod w zależności od ciepłooporności badanych szczepów.

Badając proces kiełkowania pod wpływem ciśnienia (HHP), w modelowych warunkach doświadczenia na buforze Doktorantka obserwowała uwalnianie niewielkich stężeń DPA. Stężenia kwasu dipikolinowego uwalnianego przez przetrwalniki w sokach jabłkowych wahały się od 58,3% dla szczepu wysoce termoopornego, do 71,2% w przypadku szczepu bardziej wrażliwego i były uwarunkowane wysokością temperatury procesu.

Rezultaty uzyskane przez Doktorantkę potwierdziły zawarte w literaturze przedmiotu obserwacje innych autorów odnośnie działania ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym na przetrwalniki *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Z przywołanych przez Doktorantkę wcześniejszych badań wynikało, że największe stężenia DPA były uwalniane podczas sterylizacji i były porównywalne dla obu szczepów. Prowadzone przez mgr Porębską obserwacje nad wpływem SCCD wykazały, że maksymalne uwalnianie kwasu dipikolinowego przez przetrwalniki szczepu TO-169/06 zachodziło przy największej stosowanej wartości parametrów tj. ciśnienia 60 MPa i temperaturze 75<sup>0</sup>C przy jednoczesnym kiełkowaniu populacji o liczebności 3,38 log jtk.

Badania dotyczące oceny uwalnianego z przetrwalników DPA uważam za szczególnie istotne dla pełnej charakterystyki fizjologii kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w środowisku soków jabłkowych. W mojej opinii jest to najważniejszy fragment prowadzonych doświadczeń.

W tej części badań Doktorantka potwierdziła również istotny wpływ stężenia jonów wodorowych i temperatury na wielkość populacji komórek stwierdzanych po procesie kiełkowania i stężenie uwalnianego w tym procesie kwasu dipikolinowego.

Wyniki uzyskane przez mgr Porębską w czasie oceny wpływu L-alaniny na kiełkowanie wykazały, że dynamika procesu jest największa przy pH 4. W tych warunkach obserwowano maksymalne uwalnianie kwasu dipikolinowego. Podobny kierunek zmian stwierdzano dla obu testowanych szczepów, przy czym TO-117/02 wykazywał niższe stężenie uwalnianego DPA oraz słabszą dynamikę tego procesu.

Rezultaty tych badań doprowadziły Doktorantkę m.in. do wnioskowania, o zróżnicowanym wpływie wieloskładnikowych substratów odżywczych na proces kiełkowania przetrwalników w stosunku do stwierdzanego w przypadku obecności L-alaniny.

W swoich badaniach Doktorantka wykazała, że ilość białek uwalnianych z przetrwalników podczas kiełkowania była znacząco różna od ilości stwierdzanej w tych próbkach, w których nie dochodziło do inicjowania procesów za pomocą czynników fizycznych i chemicznych.

W tej części badań zabrakło mi porównania cech uzyskanych białek do ich właściwości opisanych przez innych autorów, celem uwiarygodnienia stwierdzeń o aktywności genów odpowiedzialnych za uwalnianie tych związków.

Niefortunnym sformułowaniem wydaje się też stwierdzenie Doktorantki (str. 28) cytując: „Stwierdzono, że obecność L-alaniny i mieszaniny AGFK w środowisku pobudzała proces kiełkowania przetrwalników, a ilość uwalnianego DPA była skorelowana z procesem” Zapewne został zastosowany to skrót myślowy.

### **Nowatorstwo badań**

Podsumowując należy stwierdzić, że istotną zaletą opisywanych badań jest przemyślany dobór szczepów pozwalający na ocenę dynamiki kiełkowania i procesów temu towarzyszących w zależności od termooporności przetrwalników.

W wyniku przedstawionych doświadczeń Doktorantce udało się potwierdzić przydatność szybkiej metody optycznej do badań kiełkowania przetrwalników testowanych bakterii pozwalającej na uchwycenie krytycznego momentu tego procesu.

Rezultaty jej badań przyczyniły się do oceny uwarunkowań stosowania metody nadkrytycznego ditlenku węgla w przypadkach wysokiej ciepłooporności przetrwalników.

Doktorantce powiodła się również próba wyznaczenia optymalnych parametrów obu badanych metod utrwalania (HHP i SCCD), a także rodzaju substancji chemicznych, które sprzyjały uchwyceniu najbardziej istotnego etapu procesu kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w sokach jabłkowych.

Do nowatorstwa tej pracy zaliczyłabym jednak przede wszystkim potwierdzenie możliwości stosowania oceny stężeń uwalnianego kwasu dipikolinowego jako wskaźnika skuteczności procesu utrwalania soków jabłkowych za pomocą analizowanych metod.

Interpretacja wyników badań mikrobiologicznych nastrocza wiele trudności, stąd na podkreślenie zasługuje zdolność Doktorantki do interpretacji wyników badań oraz prowadzenia dyskusji tych wyników. Na uwagę zasługuje również dobrze dobrany materiał graficzny obrazujący wyniki badań. Wnioski zawarte w rozprawie nie budzą zastrzeżeń

## Wnioski końcowe

Przedłożony do recenzji cykl dziewięciu publikacji składających się na rozprawę doktorską należy uznać za dzieło spójne tematycznie, odpowiadające wymogom stawianym dysertacjom na stopień doktora. Oświadczenia współautorów tych publikacji potwierdzają znaczący wkład Doktorantki w realizację celu badawczego pracy.

W kolejnych publikacjach Doktorantka udowadniała, że na dynamikę kiełkowania przetrwalników dwóch różniących się termoopornością szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* wywiera wpływ szereg czynników takich jak: pH, temperatura, czas, obecność chemicznych substancji indukujących i określiła optymalne wartości ich efektywnego działania. Należy stwierdzić, że został zrealizowany założony cel rozprawy.

Jednocześnie mgr Porębska dowiodła, że wysokie ciśnienie hydrostatyczne i stosowanie ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym mogą stanowić alternatywne metody utrwalania soków.

Przedłożona do recenzji rozprawa stanowi przyczynek do poszerzenia wiedzy w zakresie możliwości optymalizowania technologii produkcji napojów owocowych i w tym względzie należy podkreślić użyteczną wartość przedłożonej pracy.

Rozprawa jest też szerokim kompendium wiedzy na temat dynamiki i fizjologii procesu kiełkowania przetrwalników szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* potwierdzającym wysoką znajomość zagadnień oraz zdolność do rozwiązywania problemów badawczych przez Doktorantkę.

Badania zaprezentowane przez mgr inż. Porębską, należy również uznać za wnoszące znaczne, nowe elementy wiedzy w dziedzinie nauk rolniczych.

Zamieszczone w treści recenzji uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, mają jedynie charakter dyskusyjny.

Z uwagi na znaczne wartości poznawcze, znamiona nowości naukowej, wysoką kwantyfikację pracy wyrażoną punktacją Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i współczynnikiem Impact Factor, stwierdzam, że cykl publikacji „Molekularna analiza mechanizmów i badanie dynamiki procesów kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem wybranych czynników aktywujących” autorstwa mgr inż. Izabeli Porębskiej spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach w zakresie sztuki i wnioskuję o jego przyjęcie przez Radę Wydziału Nauki o Żywności oraz dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony.

