



Prof. dr hab. Jan Fiedurek
Uniwersytet M. Curie Skłodowskiej
Zakład Mikrobiologii Przemysłowej
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

Lublin, 24. 01. 2017 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Izabeli Porębskiej pt.: „Molekularna analiza mechanizmów i badanie dynamiki procesów kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem wybranych czynników aktywujących”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Izabeli Porębskiej, została wykonana w Zakładzie Technologii Przetworów Owoców i Warzyw IBPRS. Promotorem pracy jest prof. dr hab. prof. dr hab. Łucja Łaniewska-Trokenheim a promotorem pomocniczym dr hab. inż. Barbara Sokołowska.

Straty wynikające z niewłaściwego przechowywania żywności oraz konieczności transportu są obecnie oceniane w skali światowej na ponad 30%, mimo stosowania różnych sposobów konserwacji, dających szansę przedłużenia czasu jej przechowywania oraz bezpiecznego spożywania. Przemysł spożywczy poszukuje nowocześniejszych metod utrwalania żywności, które będą bezpieczne dla zdrowia człowieka i w minimalnym stopniu wpłyną na zmiany właściwości fizykochemicznych uzyskanych produktów. Główną przyczyną poszukiwania przez naukowców oraz producentów żywności nowych koncepcji i kierunków rozwoju produktów są zmieniające się preferencje konsumentów. Współczesny konsument poszukuje produktów bezpiecznych dla zdrowia, o wysokiej wartości odżywczej, wygodnych w przygotowaniu i równocześnie łatwych w przechowywaniu. Oczekuje on, że zastosowane metody przetwarzania i utrwalania nie wywołają w produkcie większych zmian sensorycznych, natomiast znacznie poprawią czystość mikrobiologiczną, a tym samym bezpieczeństwo oraz wydłużą jego trwałość.

Kiełkowanie przetrwalników bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem różnych czynników jest procesem złożonym i mało poznany. Przetrwalniki pozostające w fazie głębokiego uśpienia, stanowią istotny problem w projektowaniu skutecznych procesów utrwalania żywności. Jak dotąd brak doniesień z krajowych ośrodków naukowo-badawczych dotyczących wykorzystania metod biologii molekularnej do badania mechanizmów kiełkowania bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*.

Badania dotyczyły oceny procesu kiełkowania i inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem zaproponowanych innowacyjnych technik utrwalania żywności. Przetrwalniki termofilnych kwasolubnych bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris* są odporne na działanie czynników zewnętrznych i mogą się rozwijać w sokach w czasie przechowywania. Wytwarzają związki o dezynfekcyjnym zapachu, m.in. gwajakol i prowadzą do zepsucia soków. Zwiększenie stopnia kiełkowania przetrwalników w procesie utrwalania żywności może przyczynić się do ich skutecznej inaktywacji.

W tę tematykę doskonale wpisuje się rozprawa doktorska mgr inż. Izabeli Porębskiej. Warto przy tym zaznaczyć, że podjęcie tego typu badań otwiera drogę do projektowania skutecznych procesów utrwalania żywności z wykorzystaniem technik takich jak wysokie ciśnienie hydrostatyczne i ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym, które umożliwiają produkcję trwałej i bezpiecznej żywności, przy korzystniejszym zachowaniu wartości odżywczych i sensorycznych w porównaniu do aktualnie dostępnych technik z wykorzystaniem bardzo wysokiej temperatury.

Prezentowane osiągnięcie naukowe Doktorantki obejmuje 9 tematycznie spójnych prac spośród których 5 opublikowano w czasopismach naukowych z listy Journal Citation Report (JCR) pod ogólnym tytułem „Molekularna analiza mechanizmów i badanie dynamiki procesów kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem wybranych czynników aktywujących”. W mojej ocenie publikacje mgr inż. Izabeli Porębskiej prezentują wysoki poziom naukowy, o czym świadczy fakt opublikowania ich w renomowanych czasopismach takich jak: *High Press. Res. J.*; *Food Control.*; *Nutr. Food Sci.*; *Pol. J. Microbiol.*; *Acta Biochim. Pol.* Sumaryczny Impact Factor ww. publikacji wynosi 7,697 (co średnio stanowi IF równy 0,85 dla 1 publikacji), a suma punktów MNiSW 8 prac (jednej nie podano) wynosi 120. Jest to stosunkowo wysoki wskaźnik jakości prac publikowanych przez Doktorantkę. Spośród 9 z wyżej wymienionych prac Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym

autorem we wszystkich z nich. Jej udział w realizacji tych prac jest znaczący, wynosi bowiem ponad 74,0%, o czym świadczy szczegółowy wykaz prac, które wykonała i polegał m.in: na studiach literaturowych, zaplanowaniu, nadzorowaniu i wykonaniu doświadczeń, ich analizie i opracowaniu wyników, interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz kierowaniu projektem badawczym (IBPRS) obejmującym badania przedstawione w tej pracy.

Celem pracy było określenie wpływu stresu fizycznego wywołanego m.in. wysokimi ciśnieniami hydrostatycznymi (*High Hydrostatic Pressure – HHP*) i ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (*Supercritical Carbon Dioxide – SCCD*) oraz dostępności substancji biochemicznych inicjujących i wpływających na przebieg procesu kiełkowania i inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Oprócz głównego celu Doktorantka przedstawiła szczegółowe cele, będące planem kolejnych etapów pracy, które zostały w pełni zrealizowane w trakcie wykonywania pracy doktorskiej.

W ramach realizacji zadań badawczych pracy doktorskiej powstał 9 cykl publikacji stanowiących spójny tematycznie zbiór artykułów dotyczący charakterystyki procesów kiełkowania i inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem wybranych czynników aktywujących.

We wstępie do załączonych prac mgr inż. Izabela Porębska przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat wykorzystania procesów utrwalania żywności przy odpowiednio dobranych parametrach i biochemiczne czynniki aktywujące, które inicjują proces kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*, co skutkowało zwiększoną ich inaktywacją. Fakt ten wskazuje na korzyści wynikające ze znajomości mechanizmów kiełkowania przetrwalników i celowość uwzględnienia tej wiedzy w projektowaniu procesów technologicznych.

Część literaturowa napisana jest syntetycznie. Doktorantka cytuje aż 347 pozycji literatury światowej i krajowej, w tym większość najnowszych publikacji poświęconych tej problematyce. Pozycje literatury z ostatnich 10 lat stanowią ponad 74% (250 spośród 347), jednakże część nich powtarza się w metodyce i dyskusji w poszczególnych pracach. Przegląd piśmiennictwa stanowi dobrą podbudowę teoretyczną do części doświadczalnej. Widoczne jest skoncentrowanie się na najważniejszych problemach związanych z tematyką badań. Dobór cytowani i sposób wykorzystania materiałów źródłowych oceniam jako bardzo dobry.

Część eksperymentalna pracy została wykonana zgodnie z kanonem metodycznym obowiązującym w badaniach nad nowoczesnymi sposobami inaktywacji przetrwalników i

utrwalania żywności. Na podstawie dokumentacji wyników prac eksperymentalnych stwierdzam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane.

Opisane osiągnięcie naukowe ma charakter wielowątkowy. Do najważniejszych jego elementów zaliczam:

- określenie wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (300 MPa stosowanego w temperaturze 50 i 75°C przez 5, 10, 15 min.) oraz ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym (60 MPa, stosowanego w temperaturze 50 i 75 °C przez 20, 30 i 40 min.) na procesy kiełkowania i inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* TO-117/02 i TO-169/06 w soku jabłkowym o różnej zawartości ekstraktu (70,7, 35,5, 23,7, 11,2 °Bx, pH 3.06–3.40);
- wykazanie zwiększania oporności przetrwalników wraz ze wzrostem zawartości ekstraktu, co prawdopodobnie wynika z niższej aktywności wody oraz działaniem ochronnym cukrów;
- wykazanie istotnej korelacji ($R=0,8437$) pomiędzy spadkiem gęstości optycznej a liczbą kiełkujących przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* TO-117/02. Stwarza to możliwość wykorzystania pomiaru gęstości optycznej jako szybkiej i skutecznej metody ilościowego określania stopnia kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris* oraz określenia dynamiki tego procesu i etapów kiełkowania;
- stwierdzenie, że działanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, temperatury i medium środowiska wpływały na proces kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris*. Niska wartość pH oraz podwyższenie temperatury do 50°C sprzyjały temu procesowi. Sugeruje to potrzebę uwzględnienia, przy projektowaniu procesów technologicznych utrwalania soków owocowych, procesu kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris*, zachodzącego w odpowiednich warunkach i przejścia ich w stan wegetatywny. W takim stanie są one bardziej podatne na działanie takich czynników jak ciśnienie, temperatura czy dodatek konserwantów;
- wykazanie po raz pierwszy, że obecność w środowisku L-alaniny i mieszaniny zawierającej kwas asparginowy, glukozę, fruktozę oraz potas pobudzała proces kiełkowania przetrwalników, a ilość uwalnianego kwasu dipiklinowego była skorelowana ($R = 0,8892$) z tym procesem.

Duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne ma wykazanie zróżnicowania w ilości białek przetrwalników przed i po traktowaniu czynnikami zewnętrznymi, które mogą pełnić rolę w kiełkowaniu przetrwalników. Fakt ten wskazuje na celowość uwzględnienia w dalszych badaniach mechanizmów regulujących ekspresję genów zaangażowanych w procesy kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris*.

Z aplikacyjnego punktu widzenia uzyskane wyniki są podstawą do ich wykorzystania w procesie projektowania skutecznych metod utrwalania żywności z wykorzystaniem takich innowacyjnych technik jak zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Metody te mogą bowiem być szansą na produkcję żywności trwałej i bezpiecznej, przy znacznie korzystniejszym zachowaniu wartości odżywczych oraz sensorycznych w porównaniu z aktualnymi technikami wykorzystujące bardzo wysokie temperatury.

Uwagi merytoryczne

Pewien niedosyt budzi brak dokumentacji zdjęć z wykorzystaniem np. mikroskopu elektronowego: transmisyjnego (TEM) lub skaningowego (SEM) w celu uwidocznienia oraz ułatwienia interpretacji uszkodzeń przetrwalników poddanych działaniu m.in. wysokich ciśnień i ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym.

Interesującym wątkiem pracy byłoby określenie fizykochemicznych zmian soków jabłkowych pasteryzowanych metodą HPP lub ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym.

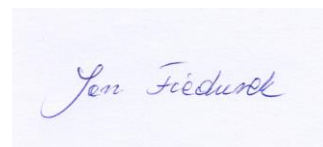
Zabrakło też informacji o potencjalnych kosztach użytych technologii w porównaniu do metod klasycznych i do jakich produktów spożywczych mogłyby być także zastosowane.

Przytoczone powyżej uwagi w niczym nie podważają wartości pracy mgr inż. Izabeli Porębskiej, są jedynie uzupełnieniem oceny wyników i dyskusyjnym tłem dla ich akceptacji, lub też wytycznymi do ewentualnego wykorzystania w przyszłych badaniach.

W mojej opinii pracę należy ocenić wysoko. Jest to konsekwentne, całościowe i dobrze wykonane studium nad dynamiką procesów kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem wybranych czynników aktywujących. Sposób przeprowadzenia eksperymentów świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i Jej dobrym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym. W dziewięciu pracach prezentujących osiągnięcie naukowe Doktorantka zamieściła bogaty i dobrze przedstawiony materiał faktograficzny. Wyniki badań noszą znamiona oryginalności i nowości naukowej. Szczególnie dotyczy to wykazania korelacji między ilością uwalnianego DPA a procesem kiełkowania przetrwalników w obecności L-alaniny i mieszaniny AGFK w środowisku oraz wykazanie zróżnicowania w ilości białek przetrwalników przed i po traktowaniu czynnikami zewnętrznymi, które mogą pełnić rolę w

kiełkowaniu przetrwalników. Oceniany cykl publikacji stanowi istotny wkład w aktualny stan wiedzy na temat procesu kiełkowania przetrwalników oraz czynników aktywujących jego przebieg, a także zróżnicowania wrażliwości *Alicyclobacillus acidoterrestris* na różne czynniki zewnętrzne.

Reasumując moją ocenę stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Izabeli Porębskiej stanowi oryginalną, wartościową pracę badawczą, na co składają się takie elementy jak: interesująca tematyka badawcza, osiągnięcie założonych celów badawczych, prawidłowo przeprowadzone eksperymenty, prawidłowo sformułowane wnioski. Omówienie i dyskusja wyników badań wskazują na umiejętność Doktorantki do formułowania i weryfikacji hipotez oraz logicznego rozumowania. W świetle powyższych danych uważam, że praca doktorska mgr inż. Izabeli Porębskiej wykonana w Zakładzie Technologii Przetworów Owoców i Warzyw IBPRS, wykonana pod kierownictwem prof. dr hab. Łucji Łaniewskiej-Trokenheim w pełni odpowiada wymaganiom ustawowym stawianym rozprawom na stopień doktorski i wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony przed Radą Wydziału Nauk o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.



Prof. dr hab. Jan Fiedurek