



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań
tel. +48 61 846 6024
e-mail: marcin.schmidt@up.poznan.pl



**WYDZIAŁ NAUK O
ŻYWNOSCI I ŻYWIENIU**

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Poznań, 02 stycznia 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Joanny Bucka-Kolendo
pt. Wpływ wysokiego ciśnienia, jako czynnika stresowego, na zmiany zachodzące w
polimorfizmie genetycznym i proteomie bakterii fermentacji mlekowej

Opracowanie niniejszej recenzji zostało wykonane zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie z dnia 11.12.2020 r. o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Joanny Bucka-Kolendo, ubiegającej się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska została napisana pod kierunkiem pani dr hab. Barbary Sokołowskiej, prof. IBPRS w Zakładzie Mikrobiologii IBPRS-PIB z udziałem promotora pomocniczego w osobie pani dr inż. Anny Otlewskiej z Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ.

Bakterie fermentacji mlekowej mają bardzo duże znaczenie dla człowieka, zarówno z punktu widzenia funkcjonowania organizmu, utrzymania dobrego stanu zdrowia jak i szeroko rozumianych aspektów przemysłowych. Organizmy, w toku ewolucji, wykształciły szereg mechanizmów odpowiedzi na czynniki stresowe pojawiające się w ich niszy ekologicznej. Dotyczy to także adaptacji szczepów produkcyjnych do warunków panujących w procesach technologicznych wpływających na ich żywotność i właściwości. Oczekiwania konsumentów odnośnie produktów spożywczych wymuszają wprowadzanie nowych technologii, jak np. wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) jako nietermicznej metody utrwalania. Bakterie fermentacji mlekowej, pomimo że HHP nie występuje w ich naturalnym środowisku są odporne na ten czynnik stresowy. Poznanie mechanizmów odpowiedzi na niego poza wiedzą z zakresu badań podstawowych niewątpliwie zostanie wykorzystane w praktyce. Dlatego też należy uznać wybór tej tematyki przez doktorantkę jako wysoce uzasadniony.

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Joanny Bucka-Kolendo, która stanowi podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, ma charakter zbioru pięciu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe. Został on opatrzony monotematycznym komentarzem zawierającym wstęp z uzasadnieniem połączenia wskazanych publikacji w jeden cykl, określenie hipotezy i celu pracy, skrócony opis przeprowadzonych badań, omówienie głównych osiągnięć, oraz bibliografię. Ponadto rozprawa zawiera kopie publikacji przedkładanych do oceny i oświadczenia o wkładzie poszczególnych autorów w ich powstanie. Przedłożony do oceny zbiór pięciu oryginalnych

recenzowanych publikacji, to prace opublikowane w latach 2017-2022, o łącznym współczynniku Impact Factor wynoszącym 11,18 oraz łącznej punktacji MNiSW o wartości 195 punktów. We wszystkich pracach doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, a jej udział własny w opracowaniu przedstawionych do oceny publikacji wynosił od 80 do 90%. Załączone oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości co do kluczowej roli doktorantki w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom dysercyjnym na stopień doktora.

Część eksperymentalna pracy jest poprzedzona rozdziałem 'Przegląd piśmiennictwa' wprowadzającym czytelnika we wszystkie istotne aspekty odnoszące się do przeprowadzonych badań. Uzupełnia on pierwszą publikację z cyklu (*Acta Biochim. Pol.* 64(3):459-464), będąca pracą przeglądową, o młodsze doniesienia z zakresu tematycznego prowadzonych przez autorkę badań, które pojawiły się po 2017 roku. Doktorantka omawia w nich dotychczasowy stan wiedzy w zakresie poznanych mechanizmów zaangażowanych w reakcję bakterii fermentacji mlekowej na różnego rodzaju stres. Oba fragmenty pracy doktorskiej stanowią doskonałe wprowadzenie czytelnika w poruszane zagadnienia i świadczą o znakomitym przygotowaniu doktorantki do pracy badawczej.

Przedstawione w drugiej pracy z cyklu (*Microorganisms* 8:813), rezultaty badań dotyczą wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na proteom bakterii fermentacji mlekowej, co jak wykazano znacząco warunkuje możliwości identyfikacyjne w oparciu o ten typ analitu. Wyniki tych badań stanowią bardzo istotny wkład w rozwój nauki, zarówno w zakresie badań podstawowych jak i aplikacyjnych, ze względu na przedstawienie dowodów na wpływ czynników stresowych na wyniki taksonomicznej identyfikacji mikroorganizmów metodą MALDI-TOF MS. Ma to istotne znaczenie w odniesieniu do zyskujących coraz większą popularność technologii 'omicznych' (z ang. *Omic*; np. proteomika, metabolomika) wskazując na konieczność krytycznego spojrzenia na otrzymane wyniki. W odniesieniu do analiz organizmów wystawionych na działanie czynników stresowych techniki wysokoprzepustowe mogą być obciążone, poza niepewnością wskazań wynikającą z uwarunkowań technicznych, błędami pochodzącymi z zmienności biologicznej oznaczanych analitów. Doktorantka trafnie wskazuje na konieczność weryfikacji uzyskiwanych wyników innymi metodami (np. poprzez analizę sekwencji 16S rDNA) pomimo uzyskania wysokich współczynników identyfikacji (Score value > 2,3) w analizie chemotaksonomicznej. A zarazem ograniczone możliwości wykorzystania tej metody do identyfikacji mikroorganizmów bezpośrednio ze środowiska produktu lub zakładu produkcyjnego.

Kolejna publikacja z cyklu (*ŻNTJ* 28(2):49-60) rozszerza badania o wyniki analizy porównawczej sekwencji kolejnego markera taksonomicznego (*pheS*). Uwzględnienie tych dodatkowych informacji nie przynosi jednoznacznego rozstrzygnięcia w kwestii identyfikacji badanych szczepów, ale potwierdza bardzo duży zakres różnorodności genetycznej istniejącej w domenie bakterii. Wskazuje, że nawet powszechnie uznawane markery genetyczne nie są doskonałe. Dodatkowym osiągnięciem, choć zbyt słabo w mojej ocenie zasygnalizowanym, jest konieczność ustalenia standardów metodycznych. Na przykładzie obu publikacji (drzewa filogenetyczne podobieństwa sekwencji 16S rDNA) stwierdzić można, że sama zmiana wersji oprogramowania zastosowanego do analizy

sekwencji (MEGA7 i MEGAX) powoduje wykazanie innego zakresu podobieństw pomiędzy tymi samymi szczepami.

Najbardziej wartościowymi, w mojej ocenie, są wyniki zawarte w czwartej publikacji z cyklu (Genes 12:1720). Dotyczą one analizy zmian ekspresji wybranych genów (*dnaK*, *hrcA* i *ctsR*), kodujących białka uczestniczące w odpowiedzi na stres, następującej po działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego o sile (300 MPa, 5 min, 20 °C) dobranej w sposób istotnie obniżający żywotność (> 2 log) a zarazem utrzymujących funkcjonowanie komórek. Wynika z nich, że zarówno wrażliwość jak i wzorce odpowiedzi na stres mają charakter, nie tylko gatunkowo-, ale także szczepozależny. Badania te stanowią istotny wkład w zakresie dyscypliny nauki technologia żywności i żywienia gdyż pozwoliły lepiej poznać molekularne mechanizmy odpowiedzi na stres bakterii fermentacji mlekowej. Bakterie z tej grupy mają fundamentalne znaczenie w przetwórstwie żywności ze względu na ich istotny udział w procesach technologicznych, ale także jako bakterie niepożądane. Dlatego też poznanie mechanizmów odpowiedzi na stres jest tak istotne ze względu na optymalizację procesów przetwórstwa żywności jak i produkcji biomasy bakteryjnej do zastosowań probiotycznych.

Piąta publikacja z cyklu (Qual. Assur. Saf. Crop. Foods 14(4):54-66) stanowi kontynuację badań opisanych we wcześniejszej. Stanowi próbę wyjaśnienia, czy zaobserwowana różnorodność ekspresji badanych genów wynika z polimorfizmu sekwencji kodujących te geny u badanych szczepów i powstawaniu mutacji adaptacyjnych w wyniku działania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Uzyskane wyniki wskazały, że oba te czynniki występują i mogą mieć znaczenie, otwierając zarazem kolejne bardzo interesujące wątki badawcze.

Przedłożony do recenzji cykl publikacji przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Łączy się on w spójną całość i przedstawia wyniki dokumentujące pełną realizację założonych celów. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo rozbudowany warsztat badawczy pani mgr inż. Joanny Buckiej-Kolendo. Posiada ona szerokie umiejętności w zakresie mikrobiologii klasycznej jak i molekularnej, analizy poziomu ekspresji genów na poziomie mRNA, oraz analiz statystycznych i bioinformatycznych. Dodatkowo należy zwrócić uwagę na jej umiejętność analizy i interpretacji wyników oraz ich dogłębnej dyskusji w odniesieniu do danych literaturowych.

Podsumowując, pani mgr inż. Joanna Bucka-Kolendo przeprowadziła cykl badań dotyczących analizy mechanizmów odpowiedzi bakterii fermentacji mlekowej na czynnik stresowy jakim jest wysokie ciśnienie hydrostatyczne. Ten typ czynnika stresowego nie występuje naturalnie w niszach ekologicznych typowych dla badanych bakterii, dlatego też reakcja na jego wystąpienie zachodzić musi z wykorzystaniem niespecyficznego szlaków sygnalizacyjnych. Wykazała, że czynnik ten wywołuje znaczne zmiany w proteomie bakterii prowadząc do błędnej identyfikacji gatunkowej z wykorzystaniem technik chemotaksonomicznych (MALDI-TOF MS). Na podstawie analizy zmian poziomów ekspresji wybranych genów kodujących białka uczestniczące w odpowiedzi na stres doktorantka wykazała, że typ reakcji ma charakter wręcz szczepozależny. Stąd też uzasadnionym krokiem była analiza polimorfizmu sekwencji badanych genów oraz wystąpienia mutacji o charakterze adaptacyjnym. Przedstawiony cykl badań stanowi nowe i znaczące osiągnięcie naukowe, które należy uznać za istotny wkład w badaną dziedzinę nauki. Jednocześnie wskazuje liczne ścieżki badawcze wynikające z uzyskanych przez nią wyników.

Stwierdzam, że uzyskane przez panią mgr inż. Joannę Bucka-Kolendo wyniki badań i ich interpretacja stanowią nowość i znaczny wkład w dyscyplinę nauk o żywności i żywieniu. Mają one duże znaczenie dla zrozumienia procesów związanych z mechanizmami odpowiedzi na stres bakterii fermentacji mlekowej. Bardzo ciekawa i dogłębna dyskusja potwierdza szeroką wiedzę doktorantki w poruszanej przez nią tematyce. Przedłożoną do recenzji pracę doktorską pani mgr inż. Joanny Bucka-Kolendo przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Uważam, że spełnia ona wymagania formalne stawiane rozprawom dysercyjnym na stopień doktora określone w art. 13 ust. 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 późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego – Państwowego Instytutu Badawczego o przyjęcie pracy i dopuszczenie pani mgr inż. Joanny Bucka-Kolendo do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. UPP dr hab. Marcin Schmidt



profesor Uczelni