

Warszawa, 07.04.2021r.

Prof. dr hab. Małgorzata Gniewosz  
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Instytut Nauk o Żywności  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### **Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Huberta Szczerby**

pt. „Charakterystyka fizjologiczna i molekularna nowych szczepów bakterii z rodziny  
*Enterobacteriaceae* jako wydajnych producentów kwasu bursztynowego”

Promotor: prof. dr hab. dr h. c. mult. Zdzisław Targoński

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Adam Kuzdrański

### **Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej**

Na świecie wzrasta zapotrzebowanie i produkcja kwasów organicznych. Mimo, że zastosowanie metod biotechnologicznych jest na razie znacznie droższe niż metod chemicznych, to ze względu na intensywny rozwój nauki, w niedalekiej przyszłości możliwe są wdrożenia opłacalnych technologii opartych na metodach biologicznych. O powodzeniu takiej strategii w dużej mierze decyduje producent kwasu organicznego, czyli szczep mikroorganizmu, zdolny do wytwarzania określonego produktu. Niewyczerpanym źródłem mikroorganizmów jest środowisko naturalne. Podjęte przez mgr inż. Huberta Szczerbę badania są jednymi z pierwszych, w których scharakteryzowano nowe naturalne odzwierzęce szczepy *Enterobacter aerogenes* zdolne do produkcji kwasu bursztynowego, a szeroko zakrojone badania identyfikacji genetycznej szczepów wraz z analizą funkcjonalną genów uznają za prekursorskie w dziedzinie technologii żywności i żywienia. W pracy doktorskiej podjęto się także opracowania metody produkcji kwasu bursztynowego z laktozy zawartej w permeacie serwatkowym. Wykorzystanie tego ubocznego



produktu przemysłu mleczarskiego wpisuje się w nurt „zielonej chemii”, który inspiruje do unowocześnienia przemysłu, zgodnie z ideą zrównoważonego rozwoju. Uważam, że dokonany przez mgr inż. Huberta Szczerbę wybór wyżej wymienionych badań jest w pełni uzasadniony.

### **Ocena formalna pracy**

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Huberta Szczerby jest cyklem publikacji naukowych pod wspólnym tytułem „Charakterystyka fizjologiczna i molekularna nowych szczepów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* jako wydajnych producentów kwasu bursztynowego”, w skład którego wchodzi 3 oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopiśmie z listy MEiN przypisanym do dyscypliny technologia żywności i żywienia (**PI**: *Biotechnology for Biofuels* 13(3): 96, 2020; **PII**: *Scientific Reports* 10(1): 1986, 2020; **PIII**: *International Journal of Molecular Sciences* 21(14): 4835, 2020). Prace te zostały opublikowane w 2020r. Suma punktów za publikacje wchodzące w cykl według listy MEiN wynosi 480, a sumaryczny współczynnik wpływu (IF) wynosi 13,369. Pełne teksty oryginalnych prac twórczych zostały dołączone do opracowania, które jest przewodnikiem i zarazem uzupełnieniem do artykułów. Opracowanie liczące 61 stron maszynopisu zawiera kilka rozdziałów. Na początku zamieszczono Streszczenie w języku polskim i angielskim. Następnymi rozdziałami są: Wprowadzenie (4 strony), Hipoteza Badawcza i Cel Pracy oraz Materiały i Metody Badawcze, które zamieszczono na 3 stronach. Prezentację wybranych wyników badań oraz ich dyskusję opracowano na 26 stronach wraz z 12 rysunkami i 4 tabelami. Wnioski i stwierdzenia przedstawiono na 2 stronach. Literatura obejmuje 58 pozycji w języku polskim i angielskim. Przedstawiony układ opracowania jest logiczny i bardzo przejrzysty. W cyklu artykułów naukowych mgr inż. Hubert Szczerba jest pierwszym autorem. Publikacje są kilkuautorskie od 4 do 8 osób. Na podstawie dołączonych oświadczeń współautorów publikacji wynika, że udział mgr inż. Huberta Szczerby w pracach wchodzących w cykl był od 75% do 90%, co świadczy o wyjątkowo dużym zaangażowaniu Doktoranta w ich realizację. W ostatnim rozdziale został przedstawiony bogaty dorobek naukowy mgr inż. Huberta Szczerby, świadczący o bardzo intensywnej aktywności naukowej, na który składają się, oprócz cyklu publikacji wchodzących w rozprawę doktorską, 10 oryginalnych prac twórczych, 9 patentów RP, 5 zgłoszeń patentowych na wynalazki biotechnologiczne i 27 doniesień konferencyjnych. Doktorant zdobył środki na badania naukowe w dwóch konkursach NCN: Preludium (2017r.) i Etiuda (2019r.) oraz w ramach projektu dla młodych naukowców Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (2017-2019). Doktorant uczestniczył także jako



wykonawca w grantie NCN Lider w latach 2016-2018 oraz zrealizował grant dla młodych naukowców UP w Lublinie w latach 2016-2017. Mgr inż. Hubert Szczerba zdobył doświadczenie naukowe podczas zagranicznych staży w Holandii i we Włoszech.

Warto podkreślić także, że mgr inż. Hubert Szczerba otrzymał 16 nagród lub wyróżnień za wybitne osiągnięcia w nauce w trakcie studiów I i II stopnia oraz podczas studiów doktoranckich. Łącznie uzyskał 5 stypendiów za wybitne osiągnięcia naukowe, w tym Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Prezydenta Miasta Lublin, Marszałka województwa lubelskiego oraz Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

### **Ocena merytoryczna pracy**

We Wprowadzeniu przygotowanym w sposób syntetyczny mgr inż. Hubert Szczerba omówił wykorzystanie kwasu bursztynowego w różnych gałęziach przemysłu, w tym spożywczego, chemicznego i farmaceutycznego, z oczekiwaną wielkością rynku bursztynianu pochodzenia biologicznego na poziomie 700 tyś. ton w 2020r. W charakterystyce obecnej produkcji kwasu bursztynowego zwrócił uwagę na (kosztowną i obciążającą środowisko) technologię chemicznej syntezy tego kwasu. Przedstawił ogólnosiwiatowy trend wykorzystania produktów odpadowych i ubocznych w biotechnologicznym pozyskiwaniu kwasu bursztynowego oraz trudności w wyborze odpowiedniego szczepu bakterii do tego procesu. Wiedza na temat producentów kwasu bursztynowego jest wciąż ograniczona. Uważam, że zawarte w części teoretycznej treści pracy świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu mgr inż. Huberta Szczerby do podjęcia badań.

W kolejnym rozdziale opracowania sformułowano hipotezę badawczą i cel pracy. Hipoteza zakłada, iż możliwe jest pozyskanie nowego szczepu bakteryjnego wykazującego zdolność do naturalnej i wydajnej produkcji kwasu bursztynowego, jako głównego produktu fermentacji laktozy z produktu odpadowego, jakim jest permeat serwatkowy. Założono także, że sekwencjonowanie genomowe i analiza funkcjonalna genów może przyczynić się do lepszego zrozumienia cech fizjologicznych nowego szczepu, zwłaszcza w kontekście zastosowań biotechnologicznych. W celu weryfikacji postawionej hipotezy, mgr inż. Hubert Szczerba przyjął cel badań tj. identyfikację oraz fizjologiczną i genetyczną charakterystykę nowego, dzikiego szczepu bakteryjnego zdolnego do naturalnej i wydajnej syntezy kwasu bursztynowego na podłożach z laktozą. Cel pracy został jasno sformułowany. Zakres pracy obejmował przeprowadzenie kilku etapów badań: pozyskanie i selekcję z prób środowiskowych szczepu bakteryjnego zdolnego do biosyntezy kwasu bursztynowego z laktozy, identyfikację gatunkową szczepu, określenie optymalnych warunków wzrostu



i produkcji kwasu bursztynowego przez pozyskany szczep, hodowle bioreaktorowe, uzyskanie kompletnej sekwencji genomu szczepu i charakterystykę jego genów.

W kolejnym rozdziale przedstawiono materiały oraz metody badań, które są dokładnie opisane w publikacjach PI, PII i PIII. Na szczególną pochwałę zasługuje fakt, że praca została zrealizowana z wykorzystaniem szerokiego wachlarza badawczego i opiera się na przemyślanym i dobrze zaplanowanym ciągu badań laboratoryjnych i doświadczeń. Duży nacisk w dysertacji położony został na badania genetyczne szczepów. W tym celu Doktorant zastosował całą gamę nowoczesnych technik biologii molekularnej, a do analizy wyników wykorzystał specjalistyczne oprogramowania bioinformatyczne. Materiałem biologicznym w pracy były dwa szczepy *Enterobacter aerogenes* oznaczone LU1 i LU2, wyselekcjonowane spośród 120 izolatów bakteryjnych z przewodu pokarmowego przeżuwaczy. Szczepy były zdeponowane w kolekcji Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka UP w Lublinie. W mojej opinii badania były wykonane przy użyciu dobrze dobranych i nowoczesnych metod, które gwarantowały uzyskanie wiarygodnych wyników.

W rozdziale „Prezentacja wybranych wyników badań oraz ich dyskusja” Doktorant przedstawił wyniki badań w oparciu o trzy oryginalne publikacje naukowe. W I etapie ustalono taksonomię izolatu bakteryjnego (LU2) produkującego kwas bursztynowy (PI i PII). W wyniku przeprowadzonej analizy proteomicznej i genetycznej izolatu LU2 oraz analizy filogenetycznej na podstawie porównania sekwencji 16S rDNA zdeponowanych w bazie danych NCBI ustalono jego przynależność do gatunku *Enterobacter aerogenes*. Następnie scharakteryzowano szczep *E. aerogenes* LU2 pod względem produkcji kwasu bursztynowego w zależności od składu podłoża hodowlanego oraz parametrów procesu produkcji. Opracowano wstępne warunki do produkcji kwasu bursztynowego w okresowej hodowli bioreaktorowej tego szczepu. Wskazano również na potencjalną możliwość zastosowania szczepu LU2 do produkcji tego kwasu z laktozy zawartej w permeacie serwatkowym. W nawiązaniu do wyników badań przedstawionych na rys. 3 i w tab.1, w trakcie obrony proszę Doktoranta o wyjaśnienie: w jaki sposób w trakcie mikrohodowli i bioreaktorowej hodowli szczepu utrzymywano warunki beztlenowe? Następnie proszę o odpowiedź: z jakimi trudnościami trzeba się mierzyć przy przemysłowym wytwarzaniu kwasu bursztynowego w warunkach beztlenowych/tlenowych? Prosiłabym również o wyeksponowanie różnic między szczepami *Enterobacter aerogenes* (LU2 a opisanymi w literaturze) we wzroście i wytwarzaniu kwasu bursztynowego.

W publikacji PII przedstawiono kompletną sekwencję genomu *E. aerogenes* LU2, a w publikacji PIII sekwencję genomu *E. aerogenes* LU1. Wykazano, że oba szczepy posiadają



po jednym pojedynczym chromosomie bez plazmidów, ze średnią zawartością nukleotydów GC na poziomie 55% i 55,6%, odpowiednio. W genomach szczepów zidentyfikowano geny i podano ich liczbę. Stwierdzono, że większość genów koduje białka. Dokonano także analizy porównawczej rozmiarów genomów obu szczepów z wybranymi szczepami z rodziny *Enterobacteriaceae*. Aby lepiej zrozumieć metabolizm szczepów w kolejnym etapie pracy przeprowadzono badania funkcjonalne zidentyfikowanych genów i przypisano je do poszczególnych kategorii funkcjonalnych. Stwierdzono, że geny zaangażowane w transport i metabolizm węglowodanów i aminokwasów oraz proces transkrypcji stanowią główną grupę genów. Na podstawie tych danych Doktorant wysunął wniosek, że oba szczepy mają dobrze rozwinięty system transportu i metabolizmu źródeł węgla i azotu, który odbywa się za pośrednictwem systemu PTS, a części węglowodanów z udziałem transporterów ABC. Stwierdzono różnice między szczepami w transporcie kilku związków. Uzyskane wyniki potwierdziły potencjalne możliwości genetyczne szczepów do metabolizowania wielu źródeł węgla o znaczeniu przemysłowym, w tym glicerolu i laktozy.

W następnym etapie badań zweryfikowano obecność genów kodujących enzymy uczestniczące w biosyntezie kwasu bursztynowego szczepów LU2 i LU1. Wykazano, że bursztynian może być wytwarzany jako końcowy produkt fermentacji poprzez redukcyjną gałąź cyklu Krebsa i szlak glioksyłanowy. Rozpoznano również system transportu zaangażowany w ekskrecji bursztynianu do pożywki wzrostowej oraz geny zaangażowane w odpowiedź na stres osmotyczny i oksydacyjny.

W toku dalszych badań zajęto się analizą genomu pod względem antybiotykooporności oraz obecności sekwencji profagowych szczepów LU1 i LU2. W genomie obu szczepów udowodniono obecność genów związanych z opornością na antybiotyki, ale nie zidentyfikowano żadnych czynników wirulencji, a także nabytych na drodze transferu genów związanych z opornością na antybiotyki, co ma kluczowe znaczenie w przemysłowym zastosowaniu szczepów.

Całość pracy zamyka rozdział przedstawiający jedenaście wniosków końcowych. W mojej opinii są one poprawnie sformułowane, w pełni uzasadnione i mają silne podstawy w przedstawionych wynikach z przebiegu pracy.

Podsumowując, w swojej rozprawie mgr inż. Hubert Szczerba podjął bardzo interesujących problem badawczy dotyczący identyfikacji nowego szczepu bakteryjnego zdolnego do wydajnej biosyntezy kwasu bursztynowego z laktozy i wykorzystaniu w tym celu permeatu serwatkowego. Wyniki przedstawionych badań wskazują na dużą przydatność szczepu *Enterobacter aerogenes* LU2 do w/w procesu. Za bardzo wartościowe i nowatorskie uznaję



badania genomów obu szczepów *E. aerogenes*, potwierdzające ich duży potencjał biologiczny do produkcji kwasu bursztynowego. Opublikowanie wyników w renomowanych czasopismach naukowych uznaję za świadectwo bardzo dobrego poziomu merytorycznego prowadzonych badań, ich poprawności metodycznej i wysokiego poziomu dyskusji merytorycznej.

### **Podsumowanie**

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Huberta Szczerby pt. Charakterystyka fizjologiczna i molekularna nowych szczepów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* jako wydajnych producentów kwasu bursztynowego, łączy aspekty naukowe z praktycznymi. Niewątpliwie stanowi rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i cenne, stanowiące istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia. Doktorant dowiódł, że dysponuje szeroką wiedzą w zakresie omawianych zagadnień i jest dobrze przygotowany do prowadzenia prac naukowo-badawczych. Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie; zarówno jej wysoki poziom merytoryczny, jak i zakres wykonanych badań. Rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane pracom na stopień doktora zawarte w art. 13.1 Ustawy z dnia 14.03.2003r. z następującymi potem zmianami, o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Huberta Szczerby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

M. Belton

Warszawa, 07.04.2021r.

Prof. dr hab. Małgorzata Gniewosz  
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Instytut Nauk o Żywności  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Huberta Szczerby  
pt. „Charakterystyka fizjologiczna i molekularna nowych szczepów bakterii z rodziny  
*Enterobacteriaceae* jako wydajnych producentów kwasu bursztynowego”**

W mojej opinii oceniana rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie ze względu na bardzo wysoką wartość merytoryczną, której miernikiem są artykuły wchodzące w skład cyklu, opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Wynikające z wyników badań możliwości aplikacyjne dotyczą w szczególności opracowania metody wytwarzania kwasu bursztynowego z zastosowaniem dobrze scharakteryzowanego nowego szczepu bakterii z użyciem permeatu serwatkowego. Mgr inż. Hubert Szczerba dysponuje wieloaspektową wiedzą i umiejętnością sprawnego posługiwania się wieloma narzędziami badawczymi, w tym technikami biologii molekularnej, co było niezbędne do opracowania podjętego tematu. Niewątpliwie świadczy to o profesjonalizmie i dojrzałości naukowej mgr inż. Huberta Szczerby.

M. Belon