



Lublin, 2 czerwca 2022

Prof. dr hab. Monika Janczarek
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Klaudii Gustaw
pt. „Rola i wykorzystanie fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego w
technologii żywności”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem dr. hab. Adama Waśko, prof. uczelni. Celem badań opisanych w rozprawie doktorskiej była izolacja nowych szczepów fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego (ang. fructophilic lactic acid bacteria, FLAB) ze środowisk bogatych we fruktozę i ich charakterystyka molekularna oraz fenotypowa, jak również poszukiwanie biotechnologicznych zastosowań tych szczepów. Bakterie FLAB należą do grupy bakterii kwasu mlekowego (ang. lactic acid bacteria, LAB) i charakteryzują się posiadaniem genomów o niewielkich rozmiarach, w wyniku ich redukcji jako efekt adaptacji do zasiedlanych nisz ekologicznych. Bakterie FLAB przystosowały się do różnorodnych środowisk bogatych we fruktozę, takich jak: nektary kwiatów, fermentowane owoce bogate w cukry proste oraz przewody pokarmowe owadów. Zjawisko to zostało określone mianem fruktofilności. Dotychczasowe informacje dotyczące tego zagadnienia naukowego są jedynie fragmentaryczne i nie obejmują swym zakresem nisz ekologicznych występujących w Polsce. Z tego powodu badania podjęte przez Doktorantkę są bardzo ważne i aktualne, nie tylko ze względów poznawczych, ale także w aspekcie przyszłych zastosowań biotechnologicznych. Mgr inż. Klaudia Gustaw realizując swoje badania naukowe mogła korzystać z dużego doświadczenia i bogatego warsztatu metodycznego promotora dr. hab. Adama Waśko, prof.

uczelni, co zaowocowało powstaniem rozprawy doktorskiej na wysokim poziomie naukowym i o dużych walorach poznawczych oraz potencjale aplikacyjnym.

Ocena formalna

Rozprawa stanowi powiązany tematycznie zbiór pięciu utworów naukowych powstałych w latach 2017- 2022, który obejmuje trzy prace eksperymentalne, jedną pracę przeglądową i jeden patent krajowy. Prace eksperymentalne zostały opublikowane w czasopiśmie: *Annals of Microbiology* (2018,68(7),459-470; 15 pkt. MNiSW, IF-1,431), *International Journal of Molecular Sciences* (2021,22(&),3780; 140 pkt., IF-5,924) i *Microbiology Resource Announcements* (2022,11(2),e00892-21; 20 pkt., IF-0,19), a praca przeglądowa w *Postęпах Mikrobiologii* (2017,56(1); 15 pkt., IF- 0,354). Dodatkowo, mgr inż. Klaudia Gustaw jest współautorem patentu krajowego nr P.429133 (75 pkt., ochrona patentu od 04.03.2019). Sumaryczny współczynnik oddziaływania tych prac (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi **IF – 7,899 i Pkt - 265**. Wyniki zawarte w wymienionych utworach stanowią oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego dotyczącego poszukiwania nowych szczepów FLAB o unikatowych cechach fizjologicznych i biochemicznych, zasiedlających różne nisze ekologiczne zlokalizowane w Polsce, jak również ich zastosowań w przemyśle spożywczym. Mgr inż. Klaudia Gustaw jest pierwszym autorem w czterech z tych prac oraz drugim autorem wśród współautorów patentu. Doktorantka określiła swój udział w powstawaniu tych prac na 85% i w przypadku patentu na 30%, co wskazuje, że Jej udział w powstawaniu tych prac był dominujący. Szkoda, że do rozprawy nie zostały dołączone oświadczenia współautorów tych prac, co ułatwiłoby recenzentowi określenie stopnia zaangażowania Doktorantki w realizację przedstawionych badań. Natomiast fakt, iż Doktorantka jest we wszystkich czterech pracach również autorem korespondencyjnym potwierdza Jej istotny wkład w ich powstanie oraz proces publikacyjny. Jedyne zastrzeżenie mam do nadmiernie zawyżonego moim zdaniem oszacowania udziału Doktorantki na 85% w przypadku pracy opublikowanej w *Int. J. Mol. Sci.*, która powstała przy udziale aż pięciu współautorów. Uwaga ta nie umniejsza mojej bardzo dobrej opinii na temat osiągnięć naukowych Doktorantki zawartych w tej rozprawie doktorskiej. Dodatkowo, na podkreślenie zasługuje fakt, iż wyniki opisane w rozprawie zostały sfinansowane z grantu Preludium 15 Narodowego Centrum Nauki (nr 2018/29/N/NZ/0098). Co zasługuje na wyróżnienie, Doktorantka posiada także bardzo bogaty dorobek naukowy niewchodzący w skład rozprawy doktorskiej, jak na ten etap kariery naukowej (łącznie 11 prac opublikowanych w latach 2016-2022 o sumarycznym IF 35,147 i pkt. 1043, 13 rozdziałów w monografiach i 17 doniesień konferencyjnych).

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim i zawiera wymagane elementy typowe dla tego typu opracowań naukowych, tj. streszczenie w języku polskim i

angielskim, wprowadzenie, hipotezę badawczą i cel pracy, wstęp pracy, materiały i metody badawcze, omówienie wybranych wyników i ich dyskusję, wnioski, spis literatury, zestawienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i pozostałego dorobku naukowego, kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Niestety nie dołączono do rozprawy wyników opublikowanych w tych pracach jako Supplementary materials, które w mojej ocenie powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej, celem przedstawienia pełnego obrazu uzyskanych wyników. Pomimo tego braku, uważam że generalnie rozprawa doktorska została przygotowana w sposób staranny, napisana zwięzłym i precyzyjnym językiem, a uzyskane wyniki zostały omówione z sposób rzeczowy i merytoryczny. Wstęp rozprawy został opisany obszernie i wyczerpuje prezentowaną tematykę badawczą. Hipoteza badawcza i cel pracy został sformułowany w sposób jasny i precyzyjny. W rozdziale Omówienie wyników zostały szczegółowo opisane kolejne etapy badań przeprowadzonych przez Doktorantkę.

Ocena merytoryczna

Obszarem swoich badań mgr inż. K. Gustaw objęła trzy różne nisze ekologiczne charakteryzujące się wysoką zawartością fruktozy, które nie były wcześniej intensywnie badane w kontekście występowania bakterii FLAB, tj. spadź wytwarzaną przez *Coccus hesperidum* L, nektary kwiatów i miód pitny. Analizując wyniki badań zawartych w kolejnych pracach zawartych w rozprawie doktorskiej widać stopniowy rozwój naukowy Doktorantki i sukcesywne wzbogacanie Jej warsztatu metodycznego.

W pierwszej pracy (Postępy Mikrobiologii) mgr inż. K. Gustaw szczegółowo opisała aktualny stan wiedzy na rok 2016, dotyczący bakterii fruktofilnych. Pozwoliło to Doktorantce zapoznać się z najnowszymi danymi i możliwościami badawczymi związanymi z tym problemem badawczym. Doktorantka wykazała, że dotychczasowa wiedza na temat bakterii FLAB jest jedynie fragmentaryczna, stąd w pełni uzasadnione było podjęcie tego tematu badawczego. W pierwszej pracy eksperymentalnej opublikowanej w *Annals of microbiology* w 2018 r., Doktorantka opisała wyniki dotyczące izolacji i charakterystyki bakterii wyizolowanych ze spadzi zebranej z ogrodów z okolic Lublina. W oparciu o analizy MALDI-TOF dla 9 z 49 uzyskanych izolatów przypisano podobieństwo do bakterii *Lactobacillus plantarum*. Dodatkowo, wykorzystując metody sekwencjonowania genu 16S rRNA i multiplex PCR genu *recA* potwierdzono przynależność tych szczepów do gatunku *Lb. plantarum*. Scharakteryzowano także własności fenotypowe tych szczepów (zdolność wykorzystania różnych źródeł węgla (C), fruktofilność (tj. preferencję fruktozy względem glukozy) i tolerancję wysokich stężeń tego cukru oraz wrażliwości antybiotykowej). Innym bardzo ważnym i interesującym wynikiem było potwierdzenie braku funkcjonalnego genu *adhE* w genomie tych bakterii, kodującego białko dwufunkcyjne o aktywności dehydrogenazy

alkoholowej i dehydrogenazy aldehydu octowego, które odgrywają kluczową rolę w metabolicznych szlakach heterofermentatywnych LAB w regeneracji NAD⁺.

Z kolejnego źródła bogatego we fruktozę - miodu pitnego Doktorantka wyizolowała bakterie, które na podstawie analiz molekularnych i filogenetycznych przypisano do gatunku *Lb. hilgardii* i reprezentatywny szczep z tej grupy nazwano FLUB. Większość badań opisanych w tej dyzertacji dotyczy charakterystyki genomu tego szczepu i jego własności metabolicznych oraz potencjalnego zastosowania biotechnologicznego. Wyniki z tej części badań uważam za najciekawsze. Stanowiły one również podstawę do uzyskania patentu na ten szczep i jego zastosowanie do produkcji mannitolu, który jest ważnym i cenionym składnikiem wielu produktów w przemyśle spożywczym (PL 237228). Doktorantka wykazała, że szczep FLUB efektywnie wytwarza mannitol w stężeniu znacząco wyższym od innych szczepów z gatunku *Lb. hilgardii* (tj. 2-krotnie więcej od szczepu referencyjnego *Lb. hilgardii* NRRL po 7 dniach hodowli na podłożu zawierającym 2% fruktozę) i jest zdolny do wytwarzania mannitolu na podłożu z syropem glukozowo-fruktozowym. W tym miejscu chciałabym zadać Doktorantce pytanie jakie widzi możliwości zastosowań szczepu *Lb. hilgardii* FLUB w przemyśle spożywczym?

W kolejnych etapach badań mgr inż. K. Gustaw przeprowadziła analizy mające na celu scharakteryzowanie materiału genetycznego szczepu *Lb. hilgardii* FLUB, wykorzystując do tego szeroki wachlarz metod molekularnych i bioinformatycznych. W pracy opublikowanej w 2021 r. w *Int. J. Mol. Sci.* opisała szczegółowo cechy genomu i pangenomu tej bakterii. Wykazała, że szczep FLUB zawiera znacznie większy genom (tj. 3,190,226 pz) od pozostałych dotychczas opisanych bakterii LAB i oprócz chromosomu zawiera 5 plazmidów o wielkości od 42,732 do 3,500 pz. Wskazuje to, że u tego szczepu nie doszło do tak intensywnego zmniejszenia wielkości genomu w toku ewolucji jak u innych bakterii LAB, co sugeruje wykształcenie innego mechanizmu przystosowania do niszy bogatej w cukry proste, w tym fruktozę. Jak zatem można wyjaśnić zaobserwowane zmiany w genomie szczepu FLUB w oparciu o dane genomiczne innych bakterii FLAB i LA?. Doktorantka poczyniła również inne ciekawe obserwacje dotyczące zawartości genetycznej plazmidów szczepu FLUB. Wykazała bowiem, że są one rezerwuarem genów nadających oporność na różne metale ciężkie i że ich obecność nie była związana z osmoadaptacyjnością i przystosowaniem tej bakterii do niszy bogatej we fruktozę. Zaskakująco, również skład genowy zidentyfikowanych wysp nie wskazywał na ich znaczącą rolę w metabolizmie cukrowym. Częściowym wyjaśnieniem tych obserwacji może być fakt, iż ponad 25% genów zawartych w genomie szczepu FLUB nie zostało przypisanych do żadnej grupy funkcjonalnej COG (bardzo dużo genów zaliczono do COG R i S, gromadzących geny o nieznanym funkcjach). Było to spowodowane brakiem opisanych ortologów dla tych genów w bazach danych, co wskazuje na trudności w prowadzeniu badań genetycznych na tej grupie bakterii. Wykonanie dodatkowej manualnej anotacji genów mogłoby poprawić ten wynik i przyczynić się do identyfikacji większej liczby

genów i białek zaangażowanych w transport i metabolizm cukrowy. Doktorantka uzyskała także interesujące wyniki dotyczące pangeomu i genów unikatowych dla tego szczepu bakterii. Otrzymane dane w pewnym stopniu wyjaśniają zdolność szczepu FLUB do wzrostu w wysokich stężeniach cukrów prostych (fruktozy i glukozy). Warto byłoby te badania wzbogacić o aspekt przeżywalności tej bakterii w takich warunkach hodowlanych. W żadnej pracy nie doszukałam się eksperymentu, w którym zostałby określony wpływ wysokich stężeń tych cukrów na proporcję żywych i martwych bakterii. Pomiar samej gęstości optycznej hodowli bakteryjnej nie uwzględnia tego istotnego parametru, gdyż z uwzględnieniem również obecności martwych bakterii. Stąd, analiza przeżywalności bakterii mogłaby dostarczyć dodatkowych ciekawych wyników. W tym miejscu chciałabym zapytać Doktorantkę o aktualny stan wiedzy na temat molekularnych mechanizmów osmoadaptacyjności bakterii FLAB związanej z ich przystosowaniem do nisz bogatych we fruktozę.

W ostatniej pracy opublikowanej w *Microbiology Resource Announcements* w 2022 r. mgr inż. K. Gustaw przedstawiła informacje o zsekwencjonowanych genomach dwóch szczepów 7K11C i 7K4AA, wyizolowanych z nektarów kwiatów, które zaklasyfikowano do *Apilactobacillus kunkeei*. Dodatkowo, przeanalizowano sekwencję szczepu referencyjnego tego gatunku bakterii, DSMZ 12361. Uzyskane sekwencje zdeponowano w bazie danych GenBank i poddano jedynie bardzo ogólnej analizie (dane zawarte w jednej tabeli). Niestety nie wykonano bardziej szczegółowej analizy bioinformatycznej i genetycznej tych danych, obejmujących między innymi przypisanie ich do grup funkcjonalnych, porównanie zawartości genowej chromosomów i plazmidów. Stąd moje pytanie, dlaczego te badania zostały przeprowadzone w tak okrojonym zakresie?

Podsumowując, mgr inż. Klaudia Gustaw podjęła się realizacji bardzo ciekawego i ambitnego tematu badawczego, biorąc za cel swoich badań poszukiwanie szczepów charakteryzujących się fruktofilnością, o ciekawych i potencjalnie użytecznych cechach fizjologicznych. Doktorantka w pełni zrealizowała zaplanowany cel badawczy i otrzymała wiele interesujących i wartościowych wyników, które wzbogacają naszą wiedzę z zakresu bakterii zasiedlających nisze o wysokim stężeniu cukrów prostych. Podczas wykonywania badań zapoznała się i z dużym powodzeniem stosowała różnorodne techniki i metody mikrobiologiczne, genetyczne, biochemiczne i bioinformatyczne.

Na szczególne podkreślenie zasługują niektóre z uzyskanych wyników. Do najważniejszych wyników uzyskanych w ramach tej rozprawy doktorskiej zaliczam:

- 1) identyfikację bakterii *Lb. plantarum* wyizolowanych ze spadzi *Coccus hesperidum* L. i scharakteryzowanie ich profilu metabolicznego i fruktofilności;
- 2) izolację szczepu *Lb. hilgardii* FLUB ze sfermentowanego miodu pitnego o korzystnych właściwościach wysokiej tolerancji na wysokie stężenia fruktozy i zdolności wytwarzania mannitolu; wykazanie możliwości zastosowania tego szczepu w przemyśle spożywczym;

3) uzyskanie pełnej sekwencji genomu szczepu *Lb. hilgardii* FLUB wraz z identyfikacją sekwencji chromosomowej i plazmidowych, jak również scharakteryzowanie puli genów zawartych w genomie i pangenomie i przypisanie ich do grup funkcjonalnych (COG).

Podsumowując, chciałabym podkreślić ogrom pracy włożony przez Doktorantkę i docenić Jej determinację w realizacji zaplanowanych badań w celu otrzymania wielu wartościowych wyników, które pozwoliły na poszerzenie naszej wiedzy na temat funkcjonowania bakterii FLAB.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę i praktyczne umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez mgr inż. Klaudię Gustaw. Doktorantka potwierdziła swoją dojrzałość naukową jako młody badacz o dużej aktywności naukowej i bogatym dorobku publikacyjnym. Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Klaudii Gustaw ma dużą wartość naukową i potencjał aplikacyjny, gdyż przyczyniła się do znacznego wzbogacenia wiedzy dotyczącej charakterystyki genomów i przystosowań fizjologicznych bakterii FLAB do różnych nisz ekologicznych bogatych we fruktozę, występujących na obszarze Polski.

Recenzowana rozprawa doktorska pt. „**Rola i wykorzystanie fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego w technologii żywności**”, wykonana pod kierunkiem dr. hab. Adama Waśko, prof. uczelni spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Technologia Żywności i Żywnienia Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Klaudii Gustaw do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres prowadzonych badań, duży zestaw stosowanych technik i metod badawczych, wartość naukową i aplikacyjną uzyskanych wyników oraz opublikowanie ich znaczącej części w renomowanych czasopismach, jak też uzyskanie patentu, wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Technologia Żywności i Żywnienia Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.


Prof. dr hab. Monika Janczarek