Politechnika Łódzka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Łódź, dn. 24-11-2022r.

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Klewicka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Iwony Niedźwiedź zatytułowanej „Wykorzystanie zimnej plazmy w konserwacji win czerwonych", wykonanej pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Polak-Bereckiej, prof. Uczelni w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny praca jest cyklem 4 publikacji. Jedna publikacja jest opracowaniem przeglądowym pozostałe 3 publikacje są pracami oryginalnymi. Prace zostały opublikowane w latach 2019-2022 w następujących czasopismach: Polish Journal of Microbiology, Scientific Reports, Food Chemistry i Molecules. Jedna publikacja (P1) jest przeglądem literatury natomiast pozostałe 3 prace (P2, P3, P4) są pracami oryginalnymi. Wszystkie czasopisma, w których opublikowano prace są przypisane wg listy ministerialnej do dyscypliny technologia żywności i żywienia. Wartości współczynnika oddziaływania *Impact Factor* dla wymienionych czasopism zawierają się w przedziale od 0,897 do 9,231. Czasopismom wg listy Ministerstwa Edukacji i Nauki przypisano wagę punktową odpowiednio: 40 (P1), 140 (P2), 200 (P3) i 140 (P4). Zatem, można stwierdzić, że 3 z 4 publikacji przedstawionych jako dysertacja doktorska są publikacjami opublikowanymi w czasopismach wysoko punktowanych. Wszystkie publikacje składające się na dysertację doktorską są wieloautorskie. W pierwszej publikacji (P1) jest 4 autorów a deklarowany udział Doktorantki to 80%. Druga publikacja (P3) jest autorstwa a 8 autorów a Doktorantka deklaruje swój udział na 60%.

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

W publikacji trzeciej (P3) jest również 8 autorów przy deklaracji udziału Doktorantki na 60%. W publikacji 4 (P4) jest 4 autorów przy deklaracji wkładu Doktorantki oszacowanej na 70%. Zatem, średnio udział Doktorantki w w/w pracach wynosi 67,5%, ponadto w 2 pracach Pani mgr inż. Iwona Niedźwiedź występuje w roli autora korespondencyjnego co świadczy o wiodącej roli Doktorantki w prezentowanych pracach.

Dodatkowo cykl publikacji został opatrzony opisem (dalej zwanym komentarzem) zawierającym: streszczenie pracy w języku polskim i angielskim; wprowadzenie, materiały i metody badawcze, prezentację wybranych wyników badań wraz z dyskusją, wnioski i stwierdzania, literaturę, zestawienie dorobku naukowego Doktorantki, oraz załączniki – kopie publikacji stanowiących dysertację doktorską.

Dobór i znaczenie tematyki

Zanieczyszczenia mikrobiologiczne żywności stanowią duży problem, z którym borykają się producenci żywności ale również i konsumenci. Drugim ważnym aspektem jest problem marnowania żywności, gdzie jednym z powodów jest psucie się. Znanych jest wiele metod konserwowania żywności. Ze względu na koszty i łatwość stosowania oraz dostępność najbardziej rozpowszechnionym sposobem utrwalania żywności obok obróbki termicznej jest utrwalanie żywności poprzez stosowanie chemicznych konserwantów. Niemniej, ciągle rosnąca świadomość konsumenta i niski poziom akceptacji tej metody skłania zarówno producentów jak i naukowców do poszukiwania alternatywnych metod, które nie będą ingerowały znacząco w skład chemiczny, właściwości odżywcze i zdrowotne produktów żywnościowych. Zatem podjęta przez Doktorantkę tematyka dekontaminacji mikroorganizmów zanieczyszczających czerwone wina zimną plazmą jest aktualna, ciekawa o dużym potencjale aplikacyjnym.

Ocena merytoryczna pracy

Kandydatka do stopnia doktora w swojej dysertacji wskazuje zimną plazmę jako proces, który może dekontaminować mikroorganizmy zanieczyszczające żywność i w ten sposób uzyskać efekt konserwujący. Destrukcyjne działanie zimnej plazmy na mikroorganizmy (bakterie, przetrwalniki, grzyby oraz wirusy) zostało udokumentowane w dostępnej literaturze a proces ten znalazł zastosowanie w wielu obszarach takich jak: medycyna, rolnictwo i ochrona środowiska, co Kandydatka dokładnie opisuje w pracy przeglądowej (P1) dotyczącej działania, mechanizmów inaktywacji mikroorganizmów i

zastosowań jak i czynników mających wpływ na efektywność procesu. Przygotowanie pracy przeglądowej na tym etapie rozwoju naukowego jest trudne niemniej tutaj wyzwanie zostało zakończone sukcesem i dało Doktorantce solidną podstawę teoretyczną do planowania części eksperymentalnej.

Jako układ (model) badawczy do badań Kandydatka wybrała wino czerwone. Wina czerwone ze względu na zawartość związków o wysokiej aktywności biologicznej – czyli polifenole a w szczególności resweratrol (dla którego przeprowadzono wiele badań potwierdzających jego korzystne działanie promujące korzyści zdrowotne na organizm człowieka) są wrażliwe na termiczny proces utrwalania, podczas którego następuje degradacja polifenoli. To z kolei wpływa nie tylko na zdrowotne walory win czerwonych (oczywiście spożywanych w ilościach umiarkowanych) ale również na walory sensoryczne i organoleptyczne co będzie miało odzwierciedlenie w barwie, smaku czy zapachu. Obecnie winna konserwuje się dwutlenkiem siarki (SO_2), który dodawany jest zazwyczaj w postaci pirosiarczynu potasu ($K_2S_2O_5$). Związki te oprócz aktywności przeciwdrobnoustrojowej również zapobiegają nieenzymatycznemu utlenianiu win. Niestety nie są one obojętne jeśli chodzi o cechy sensoryczne win (pogarszają je) oraz zdrowie konsumentów.

Przystępując do części eksperymentalnej Doktorantka postawiła hipotezę badawczą: „Zimna plazma może być wykorzystywana jako alternatywna metoda konserwacji czerwonego wina", którą rozwinęła o 3 hipotezy szczegółowe:

1. „Zimna plazma działa antybakteryjnie względem *Lentilactobacillus hilgardii* oraz może wpływać na morfologię i fizjologię komórek indukując u nich stan VBNC.
2. Zimna plazma może wpływać w sposób jakościowy i ilościowy na zawartość związków bioaktywnych w czerwonym winie oraz na jego właściwości fizykochemiczne.
3. Efektem zastosowania zimnej plazmy jako metody konserwacji czerwonego wina może być poprawa jakości produktu w porównaniu z zastosowaniem metody tradycyjnej wykorzystującej pirosiarczyn potasu".

W celu weryfikacji hipotez Doktoranta wytyczyła 5 celi jednostkowych. Jako materiał biologiczny do badań modelowych został wybrany szczep *Lentilactobacillus hilgardii* (*L. hilgardii*; NRRL B-1843, Agricultural Research Service Culture Collection, USA). Szczep ten został wyizolowany z wina i cechuje się wysoką odpornością na niekorzystne warunki środowiska oraz opornością na obecność alkoholu w stężeniu do 20%. Z kolei matrycą żywnościową podawanej działaniu zimnej plazmy było wino czerwone

wytworzone w winnicy „Dom Bliskowice" (woj. lubelskie) z winogron odmiany Regent i Rondo (1:1), zebranych w październiku 2019 roku. Uzyskane wino podzielono na 3 części a każdą z nich poddano innej metodzie konserwacji: a) metodą tradycyjną poprzez dodatek 30 mg/L lub 100 mg/L pirosiarczynu potasu; b) metodą łączoną – zimna plazma i dodatek 30 mg/L pirosiarczynu potasu; c) zimną plazmą. Próby po procesie konserwowania przechowywano przez 3 miesiące w temperaturze 15°C bez dostępu światła.

Wpływ zimnej plazmy na zmiany fizjologiczne i morfologiczne bakterii *Lentilactobacillus hilgardii* opisano w publikacji „Morphological and physiological changes in *Lentilactobacillus hilgardii* cells after cold plasma treatment" opublikowanej w czasopiśmie Scientific Reports (publikacja P2). Do badań wybrano 1 z 4 testowanych systemów generacyjnych zimnej plazmy a mianowicie wykorzystujący generator wyładowań dielektrycznych (DBD - dielectric barrier discharge) oraz gaz roboczy będący mieszaniną helu i tlenu, w czasie trwania procesu 5, 10 i 15 minut.

Analizując diagramy uzyskane w wyniku oceny stanu fizjologicznego bakterii *Lentilactobacillus hilgardii* po procesie traktowania zimną plazmą stwierdzono, że efektywny był proces trwający 15 minut gdzie 98,8% klasyfikowało się we frakcji Q1 przypisanej do komórek martwych. Stosując 5 minutowy czas „plazmowania" w zasadzie nie uzyskuje się znaczącego obniżenia ilości komórek w stosunku do próby kontrolnej. Zarówno liczebność jak i stan fizjologiczny są porównywalne w wymienionych próbkach. Istotne dla wyjaśnienia mechanizmów działania zimnej plazmy na bakterie *Lentilactobacillus hilgardii* są wyniki uzyskane podczas działania zimną plazmą na zawiesinę bakterii prze 10 minut. A mianowicie stwierdzono, że około 77% populacji bakterii osiągnęło tzw. stan średniej aktywności, który może być również stanem definiowanym jako VBNC. Tym bardziej, że podczas analizy wzrostu populacji badanych bakterii ich w tej próbie odnotowano przyrost bakterii w około 80 godzinie hodowli. Doktorantka przeprowadzając dodatkowe analizy tzw. resuscytacji na odpowiednio przygotowanym podłożu mikrobiologicznym zweryfikowała pozytywnie hipotezę, że komórki bakterii *Lentilactobacillus hilgardii* w wyniku działania na nie zimną plazmą przechodzą w stan VBNC, co można zakwalifikować do strategii obronnych tych bakterii w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Dodatkowo Doktorantka wykonała obrazowanie powierzchni i komórek *Lentilactobacillus hilgardii* poddanych procesowi „plazmowania" wykorzystując do tego celu skaningową mikroskopię elektronową oraz mikroskopię sił atomowych. Analiza ta pozwoliła określić

rozbieżności w topografii i właściwościach powierzchniowych komórek (PT_10) w trzech różnych stanach fizjologicznych (aktywny, średnio aktywny, martwy) w porównaniu do komórek kontrolnych. Zmiany jakie zaszły we frakcji Q2 (komórki średnio aktywne) to: wielkość komórek uległa zmniejszeniu, a profil średnicy przekroju wzrósł dwukrotnie co świadczy o zmianie kształtu komórek z typowego wydłużonego dla *Lentilactobacillus hilgardii* na kulisty. Zaobserwowane zjawisko Doktorantka przyporządkowuje do strategii badanych bakterii przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Ostatnim przedstawionym w publikacji P2 zagadnieniem była analiza chemicznych modyfikacji zewnętrznej struktury komórek *Lentilactobacillus hilgardii* poddanych działaniu zimnej plazmy (PT_10) przeprowadzona przy użyciu techniki FT-IR. Analiza wykazała obniżenie intensywności widma przy długości fali 2920 cm^{-1}, związany z grupą kwasów tłuszczowych CH_3 i CH_2, zaobserwowano intensywne pasma pochodzące od jonu karboksylanowego, a także wzrost intensywności pasma 1720 cm^{-1} wskazującego na tworzenie się nowych grup karbonylowych, takich jak aldehydy ketony lub kwasy. Zmiany te Doktorantka słusznie powiązała ze zmianami dotyczącymi struktur w błonach cytoplazmatycznych i ściany komórkowej. Podsumowując ten etap badań Doktorantka pozytywnie zweryfikowała pierwszą z postawionych wcześniej tez.

W publikacjach: P3 – "The impact of cold plasma on the phenolic composition and biogenic amine content of red wine", (Food Chemistry) i P4 – "Comparison of the effect of cold plasma with conventional preservation methods on red wine quality using chemometrics analysis" (Molecules) Doktorantka prezentuje wyniki badań dotyczące wpływy zimnej palzmy na jakość wina czerwonego z uwzględnieniem czasu przechowywania takiego produktu. W realizacji tej części badań Kandydatka wybrała dwa systemy plazmowania różniące się zastosowanym gazem roboczym – mieszanina He/O_2 lub He/N_2 a czas trwania procesu wynosił 2, 5, i 10 minut.

Oceniono różnice jakościowe i ilościowe w profilu związków fenolowych w badanych próbach wina, które poddano różnym procesom (wariantom) konserwacji oraz trzymiesięcznemu przechowywaniu. Najliczniejszą grupę w puli związków bioaktywnych w winach czerwonych stanowią antocyjany, które nadają barwę i są odpowiedzialne za jej stabilność. Niestety antocyjany są związkami nietrwałymi, które w środowisku wodnym ulegają odwracalnym przemianom wywołując tym samym zmianę barwy. Jest to proces zależny od wartości pH środowiska. Doktoranta wykazała, że metoda tradycyjna konserwacji win czerwonych wywiera minimalny wpływ na obniżenie

zawartości antocyjanów. Natomiast ocena zawartości antocyjanów w próbkach nieprzechowywanych wskazuje, iż proces plazmowania trwający przez 10 minut (He/O_2) spowodował najwyższą redukcję całkowitego stężenia antocyjanów w stosunku do kontroli (580,36 mg/L). Natomiast stosując do konserwacji zimną plazmę (generowaną z wykorzystaniem mieszaniny gazów hel/azot) Doktorantka odnotowała wzrost stężenia antocyjanów wraz ze wzrostem czasu trwania procesu. Sumaryczne stężenie po czasie 2, 5 oraz 10 minut wynosiło odpowiednio: 707,23; 747,74; 755,25 mg/L (próba kontrolna 731,78 mg/L). W pozostałych grupach związków bioaktywnych Doktorantka odnotowała nieznaczne wahania zarówno podwyższające jak i obniżające stężenia badanych związków. Co ciekawe stężenie cis-resweratrolu w próbach przed i po przechowywaniu pozostała na niezmienionym poziomie. Niewielki przyrost stężenia odnotowano w próbkach poddanych działaniu zimnej plazmy (10 min., He/O_2), a następnie przechowywanych przez 3 miesiące. Odwrotną zależność zaobserwowano dla trans-resweratrolu.

Odrębną grupą związków (w tym przypadku niepożądaną), są aminy biogenne, które powstają głównie na drodze dekarboksylacji aminokwasów będącej wynikiem działalności mikroorganizmów głównie należących do bakterii kwasu mlekowego. Oczywiście ich stężenie będzie uzależnione od prekursorów obecnych w środowisku czyli aminokwasów, pH środowiska, stężenia alkoholu oraz dwutlenku siarki. Doktorantka stwierdziła, iż dominująca aminą biogenną w badanym winie czerwonym jest histamina. Badając wpływ sposobu konserwacji prób wina czerwonego na zawartość pozostałych amin biogennych we wszystkich przypadkach metoda łączona powodowała najwyższą redukcję stężenia tych związków. Co więcej, uzyskany efekt utrzymywał się po 3-miesięcznym okresie przechowywania. Uzyskane wyniki wskazują, że na skuteczność zimnej plazmy w redukcji amin biogennych w badanym winie czerwonym wpływa czas trwania procesu oraz rodzaj zastosowanego gazu roboczego. Co sugeruje, że proces plazomwania może być stosowny nie tylko w celu dekontaminacji mikroorganizmów ale również w celu poprawy składu odżywczego żywności poprzez eliminację amin biogennych z tego środowiska.

W czwartej publikacji cyklu pt.: "Comparison of the effect of cold plasma with conventional preservation methods on red wine quality using chemometrics analysis" (Molecules) Doktorantka prezentuje analizę chemometryczną zmian, którym podlega czerwone wino podczas różnych wariantów plazmowania, procesu mieszanego i konserwacji konwencjonalnej. Analiza ma wykazać czy zmiany zachodzące podczas

procesów konserwacji mogą wpływać na ocenę jakości wina przez konsumentów. Oceniono parametr ΔE*, który wskazuje, czy różnice w barwie pomiędzy próbką kontrolną a badaną mogą być dostrzeżone przez ludzkie oko (ΔE* ≥ 3). Doktorantka stwierdziła, że zmiana barwy po zastosowaniu większości zabiegów była niezauważalna (ΔE* ≤ 3,0) lub prawie niezauważalna (ΔE* ≤6,0) dla ludzkiego oka, z wyjątkiem metody łączonej (2 min., He/O2) i konwencjonalnej (100 mg/L $K_2S_2O_5$): ΔE* odpowiednio 11,81 i 10,98. W dalszej części przedstawiono analizę chemometryczną, która opisywała zależności między zastosowaną metodą konserwacji i poszczególnymi parametrami świadczącymi o jakości wina czerwonego. W hierarchicznej analizie skupień otrzymano trzy główne skupienia, a mianowicie klaster – w którym zgrupowano czynniki odpowiadające za kwasowość , aktywność antyoksydacyjną i skład polifenoli; klaster grupujący składowe barwy, klaster – pokazujący powiązanie obecności amin biogennych z czynnikiem mikrobiologicznym.

W prezentowanej analizie mikrobiologicznej oceniającej efektywność dekontaminacji mikroflory endogennej badanego wina czerwonego Doktorantka przedstawiła wpływ badanych metod wyjaławiania środowiska. W mojej ocenie oznaczono niefortunnie tylko ogólną liczbę bakterii metodą hodowlaną wg. Kocha. Do tego celu użyto podłoża Nutrient agar, na którym oczywiście urosną bakterie nie wymagające szczególnie bogatych podłóż. Niestety pałeczki bakterii mlekowych na tym podłożu nie urosną, lub urosną w ilości mocno ograniczonej. Ponadto, w próbie gdzie po bezpośrednio procesie plazmowania kombinowanego (He/O_2) nie obserwowano wzrostu mikroorganizmów, po 3 miesięcznym przechowywaniu zaobserwowano namnożenie bakterii do poziomu około 2,5 jednostek logarytmicznych/mL. W zasadzie po tak przeprowadzonym eksperymencie nie wiemy czy nastąpiła resuscytacja bakterii, które po plazmowaniu weszły stan VBNC czy może wzrost bakterii pochodził z aktywacji przetrwalników bakterii? Prosiłabym o komentarz do tej części eksperymentu podczas publicznej obrony. Ponadto, w prezentowanych badaniach, w publikacjach Doktorantka przedstawia działanie plazmy na bakterie *Lentilactobacillus hilgardii* w układzie modelowym. Natomiast zabrakło badań *in situ* dla tych bakterii w środowisku wina czerwonego. (Oczywiście zdaję sobie sprawę z ograniczeń przede wszystkim czasowych w realizacji projektu doktorskiego). W tym kontekście chciałbym zapytać jaki może być efekt dekontaminacji zimną plazmą bakterii *Lentilactobacillus hilgardii* lub innych bakterii kwasu mlekowego w środowisku wina czerwonego? Czy może związki

biologicznie aktywne np. polifenole mogłyby działać na bakterie w sposób ochronny? Jeśli tak to jakie mogłyby występować mechanizmy takiej ochrony?

Proszę zwrócić uwagę na prezentację wyników na wykresie 1 (Figure 1) w publikacji P4, str. 10. Przedstawiono tutaj dwa diagramy liczebności mikroorganizmów w jednostkach logarytmicznych/L. Na wykresie oznaczonym literą A, prezentującym liczę bakterii bezpośrednio po procesie plazmowania na osi rzędnych maksimum skali to wartość 3; wykres B pokazujący liczbę bakterii po 3 miesięcznym przechowywaniu na osi rzędnych maksimum skali to wartość 8. Takie przedstawienie wyników może być mylące podczas porównywania danych.

Podsumowując przeprowadzone przez Doktorantkę badania są bardzo szerokie. Pomimo, wielu wątków badań zostały one zaplanowane i przeprowadzone konsekwentnie. Zastosowane przez Kandydatkę techniki: mikrobiologiczne, chemiczne, analiza obrazowania, analiza chemometryczna są bardzo różnorodne wymagają wiedzy z zakresu mikrobiologii, chemii i fizyki i statystyki co pokazuje jakim warsztatem badacza posługuje się Pani mgr inż. Iwona Niedźwiedź.

Wniosek końcowy

Przedstawiony cykl 4 publikacji opatrzony wspólnym tytułem " **Wykorzystanie zimnej plazmy w konserwacji win czerwonych**" spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668). Założone cele badawcze zostały zrealizowane, a postawione hipotezy pozytywnie zweryfikowane. Przedstawione w pracy wyniki wpisują się nurt zagadnień badawczych prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

W oparciu o powyższe przesłanki wnioskuję do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie **o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Iwony Niedźwiedź i dopuszczenie Jej do dalszych etapów postępowania.**

Elżbieta Klewicka