

Warszawa, dn. 30.08.2022

Dr hab. Dorota Zielińska, prof. SGGW
Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Petki
pt.: „Ocena oddziaływań pomiędzy akrylamidem a mikroorganizmami występującymi
w produktach fermentowanych”**

wykonanej w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii,
na Wydziale Technologii Żywności,
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie,
pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Aleksandry Dudy-Chodak

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawą wykonania recenzji jest decyzja Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, o powierzeniu mi recenzji pracy doktorskiej, przekazana przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny dr hab. inż. Marcina Łukasiewicza, prof. URK w piśmie z dnia 14.06.2022r.

Przedmiotem recenzji jest ocena czy rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Petki spełnia wymagania stawiane w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

2. Uzasadnienie wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Akrylamid (akryloamid, amid kwasu akrylowego, 2-propenamid, skrót AA) jest organicznym związkiem chemicznym, w 1994 roku zakwalifikowanym przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) jako „prawdopodobnie kancerogeny dla ludzi”. Szkodliwość akrylamidu oraz jego metabolitów wynika ze zdolności do kumulowania się w komórkach układu nerwowego, ale związki te mogą prowadzić także do zaburzeń płodności, poronień oraz działają mutagennie i kancerogennie. W produktach żywnościowych akrylamid powstaje głównie podczas procesu obróbki termicznej żywności prowadzonego w temperaturach przekraczających 120°C, przede wszystkim w reakcji Maillarda między asparaginą i cukrami redukującymi, ale również w szlaku akroleinowym lub podczas termicznej degradacji glutenu. Wciąż rozwijający się rynek żywności przetworzonej, łatwość dostępu do tego rodzaju żywności w połączeniu z brakiem czasu i szybkim tempem życia społeczeństwa, powoduje, że narażenie na toksyczne działanie akrylamidu jest wciąż realne. Dlatego badania służące ograniczeniu takiego działania wydają się jak najbardziej uzasadnione.

Nieliczne badania sugerują, że niektóre mikroorganizmy środowiskowe, w tym te, które naturalnie występują w jelitach człowieka lub trafiają do niego wraz z pożywieniem, mogą degradować akrylamid i zmniejszać jego stężenie w otoczeniu poprzez produkcję enzymów z grupy amidaz. Interesujące jest zatem określenie, czy bakterie fermentacji mlekowej (LAB), powszechnie występujące w najbliższym środowisku człowieka, a także w żywności fermentowanej mogą skutecznie redukować stężenie akrylamidu. Wstępne badania sugerują, że jest to wysoce prawdopodobne. Warto podkreślić jednak, że jak dotąd nie wykazano jednoznacznie czy i w jaki sposób akrylamid wpływa na żywotność bakterii

kwasu mlekowego, ponadto, czy składniki żywności mogą odgrywać istotną rolę w interakcji między akrylamidem a mikroorganizmami, co wydaje się istotne z punktu widzenia skuteczności działania.

Przesłanki te uzasadniają podjęcie przez Panią mgr inż. Katarzynę Petkę badań, zmierzających do oceny czy akrylamid wpływa na mikroorganizmy występujące w żywności fermentowanej oraz, *vice versa*, czy mikroorganizmy te mogą wpływać na stężenie akrylamidu w środowisku. Podjęta w dysertacji tematyka jest aktualna i wpisuje się w zagadnienia dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia.

3. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, wprowadzenia, hipotez badawczych i celu pracy, wskazanych materiałów i metod badań, omówienia wyników uzyskanych w poszczególnych pracach stanowiących typową dysertację oraz wniosków i bibliografii. Ta część opracowania liczy 42 strony. W rozdziale Załączniki zamieszczono pełne teksty artykułów oraz oświadczenia współautorów. Układ pracy przyjęty przez Panią mgr Katarzynę Petkę jest logiczny i nie budzi zastrzeżeń. W pracy wskazano także źródło finansowania jakim jest projekt badawczy Narodowego Centrum Nauki OPUS 11 (nr 2016/21/B/NZ9/01171).

Rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór trzech artykułów, opublikowanych w latach 2020-2022 w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR):

1. **Petka, K.**; Tarko, T.; Duda-Chodak, A. Is acrylamide as harmful as we think? A new look at the impact of acrylamide on the viability of beneficial intestinal bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Nutrients* 2020, 12, 1157.
2. **Petka, K.**; Wajda, Ł.; Duda-Chodak, A. The utilisation of acrylamide by selected microorganisms used for fermentation of food. *Toxics* 2021, 9, 295.
3. **Petka, K.**; Sroka, P.; Tarko, T.; Duda-Chodak, A. The acrylamide degradation by probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* LA-5. *Foods* 2022, 11, 365.

Artykuły opublikowano w czasopismach *Nutrients* (IF=5,719, 140 pkt. MEiN), *Toxics* (IF=4,146, 70 pkt. MEiN) oraz *Foods* (IF=4,350, 100 pkt. MEiN). Sumaryczny IF za cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską wynosi: 14,215. Łączna liczba punktów za cykl publikacji (wg wykazu czasopism z 2021 r.) wynosi: 310 pkt. Wszystkie publikacje są pracami oryginalnymi, badawczymi. Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe są wieloautorskie (od 3 do 4 autorów), przy czym w każdej z nich doktorantka jest pierwszym autorem, a autorem korespondencyjnym Promotor pracy. Wyrażony procentowo udział Pani mgr inż. Katarzyny Petki w powstanie publikacji świadczy o Jej dużym zaangażowaniu i znaczącym udziale. Złożone oświadczenia Współautorów wskazują, że udział doktorantki wynosił od 70% do 80% i obejmował: współpracowanie hipotez badawczych, opracowanie metodologii badań, przeprowadzenie doświadczeń, wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów. Powyższe deklaracje świadczą o dużym zaangażowaniu i dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowej.

4. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Artykuły naukowe stanowiące podstawę dysertacji przeszły już niezależnie proces recenzji przed publikacją, z tego względu przygotowana recenzja dotyczy zbioru tychże publikacji, jako spójnej całości badań oraz opracowania, które Doktorantka przedstawiła jako rozprawę doktorską.

We **Wprowadzeniu** Doktorantka zaprezentowała w sposób spójny i kompletny problematykę badawczą rozprawy. Autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy, charakteryzując akrylamid jako substancję chemiczną, wskazała pochodzenie akrylamidu i warunki środowiska, jakie sprzyjają powstawaniu tego związku. Następnie Autorka przedstawiła strategie mające na celu zmniejszenie ilości akrylamidu w żywności i przeanalizowała zastosowanie mikroorganizmów w tym celu w oparciu o aktualne badania naukowe. Ta część przeglądu piśmiennictwa stanowi dużą wartość, gdyż zbiera i krytycznie ocenia aktywność bakterii fermentacji mlekowej w procesie degradacji akrylamidu, jednocześnie prognozując możliwość praktycznego zastosowania. Konkludując, Doktorantka wskazała braki na tym polu badawczym, które zamierzała wypełnić wynikami swoich badań. Uważam, że rozdział ten w pełni uzasadnia wybór tematu oraz celowość rozprawy, a treści w nim zawarte potwierdzają specyficzną wiedzę Kandydatki w tematyce rozprawy, ale także wskazują na znajomość szerokiego zakresu wiedzy w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

W rozdziale **Hipotezy badawcze i cel pracy** Doktorantka wskazała, że głównym celem pracy było poznanie interakcji pomiędzy akrylamidem a mikroorganizmami występującymi w żywności fermentowanej. Autorka sformułowała trzy hipotezy badawcze. Założyła, że (1) akrylamid hamuje wzrost i metabolizm mikroorganizmów obecnych w żywności, (2) składniki żywności mogą zmniejszać inhibitorowe działanie akrylamidu na drobnoustroje oraz (3) niektóre gatunki drobnoustrojów obecnych w żywności mają zdolność do obniżania stężenia akrylamidu.

Weryfikację hipotez zaplanowano w oparciu o cztery etapy prac badawczych:

- Badania wstępne (przesiewowe), których celem była ocena wpływu akrylamidu na różne bakterie i drożdże występujące w fermentowanej żywności, w tym ich liczebność i żywotność oraz wybór gatunków do dalszych badań szczegółowych.
- Ocenę wpływu akrylamidu na wzrost wybranych drobnoustrojów występujących w żywności fermentowanej, w tym wpływ różnych stężeń akrylamidu, pH, temperatury, ocena możliwości wykorzystania akrylamidu przez wybrane mikroorganizmy (aktywność enzymatyczne badania w roztworach modelowych)
- Ocenę możliwości degradacji akrylamidu przez wybrane mikroorganizmy poprzez badania w roztworach modelowych oraz weryfikacja w warunkach rzeczywistych (wpływ składników matrycy żywności).
- Badanie wpływu akrylamidu na metabolizm wybranych drobnoustrojów.

W ocenie Recenzenta zarówno cel pracy oraz hipotezy sformułowane jasno i jednoznacznie, natomiast wieloetapowy zakres prac badawczych świadczy o dojrzałym i szerokim warsztacie pracy Zespołu oraz samej Doktorantki.

Rozdział **Materiał i metody** zawiera wskazany materiał badawczy w postaci 14 szczepów czystych kultur bakterii pochodzącymi z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Niemcy) oraz 2 szczepów bakterii probiotycznych od Christian Hansen. Materiał do badań wydaje się być obszerny, choć nasuwa się pytanie: dlaczego Doktorantka nie pokusiła się o pozyskanie do badań również szczepów z polskich kolekcji mikroorganizmów, czy izolatów z żywności spontanicznie fermentowanej? W mojej ocenie wzbogaciłoby i zróżnicowałoby to materiał badawczy.

W dalszej części tego rozdziału Doktorantka zawarła szczegółowy opis metod badawczych, które zostały także przedstawione w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Doktorantka we wszystkich eksperymentach użyła dość ubogiej pożywki modelowej MRD, zawierającej jedynie 0,45% (w/v) peptonu bakteriologicznego oraz 0,45% NaCl. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie powodu takiej decyzji, w odniesieniu do informacji zawartych w pracy na str. 25 „... badania w tej pracy

prowadzone były na pożywce MRD o ubogiej zawartości węgla i azotu, a nie jak w większości innych badań na pożywkach optymalnych do wzrostu LAB.” oraz na str. 29 „... *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* nie wykazywał wzrostu w MRD, niezależnie czy akrylamid był obecny czy nie.” Badania własne wskazują zatem, że zastosowane medium nie jest odpowiednie do wzrostu niektórych bakterii z grupy LAB. Czy wobec powyższego, stwierdzenie zawarte na str. 25: „... Użyte medium (MRD) jest zatem idealne do oceny wpływu AA przy braku innych, lepiej przyswajalnych źródeł węgla i azotu” jest prawdziwe? Czy w tym wypadku mamy do czynienia z idealnym podłożem? Ponadto, w tej części pracy nie znalazłam metodyki badania morfologii bakterii, a wyniki badań dotyczące tego aspektu są istotne i interesujące. Dlatego proszę Doktorantkę o doprecyzowanie metody analizy morfologii bakterii, uwzględniając metody barwienia, obserwacji pod mikroskopem, zliczania z pól obserwacji, szacowania udziału procentowego różnych form morfologicznych, itp. szczegóły metodyczne.

Analizując tę część pracy, tzn. organizację doświadczenia, wykorzystany materiał badawczy i metodykę, stwierdzam, że praca została bardzo dobrze zaplanowana pod względem warsztatowym. Metodyka badawcza uwzględniała nowoczesne metody badań w mikrobiologii takie jak cytometrię przepływową, czy chromatografię gazową. Na szczególne podkreślenie zasługuje przeprowadzenie szczegółowej i wielokierunkowej analizy statystycznej danych, m.in. analizy składowych głównych (PCA) i zastosowanie metody powierzchni odpowiedzi (RSM) do analizy danych eksperymentalnych, co daje możliwości ekstrapolacji wyników i ich praktycznego zastosowania.

W rozdziale **Omówienie wyników** Doktorantka dokonała syntezy trzech artykułów, stanowiących cykl publikacji, które przedstawiają rezultaty kolejnych etapów badań i stanowią zwartą, jednotematyczną dokumentację realizacji celów rozprawy doktorskiej.

W podrozdziale pierwszym zatytułowanym „*Wpływ akrylamidu na wzrost drobnoustrojów – badania wstępne*” Autorka zaprezentowała wyniki badań zawarte w Publikacji 1, gdzie wykazano, że akrylamid nie hamował, a wręcz stymulował wzrost LAB, co sugeruje, że bakterie te mogą wykorzystywać akrylamid jako źródło węgla lub azotu. Istotnym, w mojej ocenie aspektem jest wykazanie, że w przypadku niektórych gatunków LAB czas inkubacji i stężenie akrylamidu miały istotny wpływ na zmiany morfologii bakterii. Doktoranta w dyskusji wskazuje potencjalne mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko. Proszę Panią Doktorantkę o odpowiedź, które z nich Jej zdaniem wydają się najbardziej prawdopodobne? Ważnym aspektem pracy jest wskazanie możliwości praktycznego zastosowania wyników uzyskanych badań w produkcji nowych produktów funkcjonalnych ukierunkowanych na zmniejszanie stężenia szkodliwego akrylamidu w żywności lub organizmie człowieka.

Podrozdział drugi, zatytułowany „*Ocena wpływu akrylamidu na wzrost drobnoustrojów obecnych w żywności fermentowanej*” zawiera prezentację i dyskusję wyników badań umieszczonych w Publikacji 2. Do tej części badań wybrano 5 mikroorganizmów, które typowo występują w mlecznej żywności fermentowanej. Doktorantka przeprowadziła badania oceny wpływu różnych stężeń akrylamidu, pH i temperatury na wzrost mikroorganizmów, a także wykazała, że wybrane mikroorganizmy są zdolne do wykorzystania akrylamidu, poprzez syntezę amidaz. Do takiego wniosku Doktorantka doszła pośrednio, obserwując statystycznie istotnie większą zawartość amoniaku (najprawdopodobniej uwolnionego z akrylamidu przez amidazę) w próbach zawierających dodatek akrylamidu do pożywki w hodowli *L. acidophilus* LA-5 (po 24 h inkubacji) niż w przypadku prób z pożywką kontrolną, tj. bez dodatku akrylamidu. Czy zostały wykonane próby jakościowe na obecność enzymów, które potwierdziłyby aktywność amidazy? Takie badanie w ocenie Recenzenta pozwoliłoby na potwierdzenie przypuszczenia zawartego w pracy. Wartościowym i praktycznym elementem pracy jest próba opracowania modeli matematycznych pozwalających na przewidywanie stężenia amoniaku

uwolnionego przez bakterie *L. acidophilus* LA-5, zgodnie z metodologią powierzchni odpowiedzi (RSM). Doktorantka w wyniku prób uzyskała wiarygodny w zakresie pH 6 do 7, temperatury 20 do 37°C i czasu 24 do 48 godzin, model pierwszorzędowy, uzyskując po weryfikacji współczynnik regresji $R^2=0,9885$, co potwierdza bardzo dobre dopasowanie modelu. Istotnym głosem w dyskusji uzyskanych wyników badań jest wykazanie, że optymalną temperaturą dla badanego procesu jest 37°C, a więc temperatura występująca w jelicie człowieka, co sugeruje, że bakterie LA-5 dostarczone np. wraz z mlecznymi napojami fermentowanymi, albo jeszcze w żywności albo już po skolonizowaniu jelita, mogłyby wykorzystywać i degradować akrylamid obecny w innych produktach żywnościowych. Dlatego też logiczną konsekwencją tego etapu badań była próba weryfikacji tej zdolności poza pożywką modelową, tj. w środowisku, w którym obecne są inne łatwo przyswajalne dla LAB źródła węgla i azotu.

Kolejne trzy podrozdziały prezentują wyniki badań zawarte w Publikacji 3. W podrozdziale zatytułowanym „*Degradacja akrylamidu przez szczep Lactobacillus acidophilus LA-5*” Doktorantka zestawiała wszystkie uzyskane wyniki badań dotyczące zdolności do degradacji akrylamidu przez probiotyczny szczep bakterii LA-5. W badaniach wykazano, że badany szczep był w stanie obniżyć stężenie akrylamidu w środowisku, z ograniczonym dostępem źródła węgla i azotu, w różnym zakresie, w zależności od zastosowanego stężenia. Na stronie 35 Autorka podaje: „Akrylamid przypuszczalnie został rozłożony i wykorzystany również w pozostałych próbkach (30 i 100 µg/ml), ale prawdopodobnie inne mechanizmy interferowały z wynikami.” (poza aktywnością amidazy). Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie jakie mechanizmy przypuszczalnie mogły zostać uruchomione w tym wypadku.

W podrozdziale zatytułowanym „*Weryfikacja zdolności do degradacji akrylamidu w warunkach rzeczywistych*” zaprezentowano wyniki eksperymentów oceniających wpływ matrycy żywności na zdolność bakterii LA-5 do degradacji akrylamidu. Wykazano, że dodanie dowolnego z podstawowych składników mleka (kazeiny, laktozy lub tłuszczu mlecznego) do podłoża, powoduje zanik zdolności bakterii do degradacji akrylamidu. Niezwykle wartościowym elementem pracy jest także ocena wpływu akrylamidu na metabolizm *L. acidophilus* LA-5. W przeprowadzonych analizach wykazano, że najwyższe zastosowane stężenie akrylamidu (100 µg/ml) miało statystycznie istotny wpływ na syntezę kwasu mlekowego przez *L. acidophilus* LA-5, a jego stężenie było 2–3 razy wyższe niż w innych próbkach. Ponadto, akrylamid niezależnie od stężenia, modulował szlaki metaboliczne *L. acidophilus* LA-5, powodując ograniczenie syntezy kwasu octowego w porównaniu z próbkami bez akrylamidu, chociaż różnice nie były istotne statystycznie. Uzyskane wyniki sugerują, że akrylamid działa wobec *L. acidophilus* LA-5 jako czynnik stresu. W mojej ocenie jest to bardzo ważny wniosek z pracy, podnoszący jej wartość naukową. Uważam ponadto, że niezwykle wartościowym aspektem tej części pracy jest szczegółowa i dojrzała dyskusja uzyskanych wyników badań, z uwzględnieniem badań innych autorów, a także własnego doświadczenia, co świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowej.

Ostatni rozdział rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Petki stanowią **Wnioski**. W mojej ocenie celowym byłoby ograniczenie tylko do faktycznych wniosków wynikających z badań. W obecnej formie wnioski są poprzeplatane stwierdzeniami z badań. I tak, w punktach 2, 3, 5 i 6 zawarte są raczej stwierdzenia z przeprowadzonych analiz, a Doktorantka niejako powieliła informacje zawarte w podsumowaniu każdej z publikacji.

Z obowiązku recenzenta wynika także ocena redakcji i technicznej strony opracowania rozprawy. Wśród drobnych uchybień zawartych w tekście należy wymienić:

- liczne błędy językowe i literowe, a także błędy stylistyczne;
- błędy w cytowanej literaturze, np. na str. 13 – [Colombo i in., 2019], w **Bibliografii** jest podany 2018r. oraz na str. 27 – [Pang i in., 2017], w Bibliografii figuruje rok 2014;

- stosowanie formy osobowej w opracowaniu, na str. 37 „... w ostatnim etapie sprawdziliśmy...” a powinno być „... w ostatnim etapie sprawdzono;
- brak cytowania pozycji 11 z Bibliografii (Keremat i in. 2011) w tekście rozprawy;
- niejednoznaczne cytowanie pozycji 9 i 10 z Bibliografii w tekście rozprawy.

Uwagi te nie obniżają wartości merytorycznej pracy, powinny jedynie służyć doskonaleniu umiejętności i warsztatu pracy naukowej Doktorantki.

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Petki stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego poznania interakcji pomiędzy akrylamidem a mikroorganizmami występującymi w żywności fermentowanej. Problematyka badawcza jest aktualna i niezwykle ważna z punktu widzenia mikrobiologii żywności i mieści się w dyscyplinie naukowej technologia żywności i żywienia. Sposób przygotowania rozprawy oraz publikacji naukowych świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowo-badawczej, dobrej znajomości warsztatu badawczego oraz umiejętności analizy wyników i wyciągania wniosków z przeprowadzanych badań. Uważam, że cel pracy został w pełni zrealizowany, hipotezy badawcze zweryfikowane, a uzyskane wyniki i ich dyskusję oceniam pozytywnie. Wszelkie uwagi krytyczne i komentarze zawarte w recenzji mają jedynie na celu wywołanie dyskusji naukowej podczas publicznej obrony.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Petki pt.: „Ocena oddziaływań pomiędzy akrylamidem a mikroorganizmami występującymi w produktach fermentowanych” spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Stawiam zatem wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Petki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

