

Dr hab. inż. Edyta Lipińska  
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Instytut Nauk o Żywności SGGW w Warszawie

Warszawa, dnia 25.09.2023r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Weroniki Piechowicz-Brzozowskiej  
pt.: „Wpływ mikroorganizmów wyizolowanych z kapusty w trakcie kiszenia  
na poziom amin biogennych”

wykonanej w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii  
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Promotor: Prof. dr hab. inż. Paweł Satora

### Ocena formalna pracy

W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej jej Autorka - **mgr inż. Weronika Piechowicz-Brzozowska** zastosowała układ typowy dla prac naukowych o charakterze empirycznym.

Praca obejmuje 149 numerowanych stron maszynopisu, na których zawarto treści uporządkowane w kolejnych rozdziałach. Spis treści, wstęp oraz przegląd literatury opracowano na 23 stronach (w tym 9 rysunków). Cel pracy, hipotezy badawcze oraz materiały i metody omówiono na 18 stronach (w tym 5 tabel). Wyniki badań i dyskusję przedstawiono na kolejnych 68 stronach, gdzie oprócz tekstu zamieszczono 11 tabel i 15 rysunków ilustrujących wyniki badań. Na podsumowanie oraz wnioski przeznaczono 4 niepełne strony. Kolejne 4 strony zajęły streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Wykaz literatury przedstawiono na 13 stronach. Obejmuje on 145 pozycji i 3 źródła internetowe, z czego 127 (87%) obcojęzyczne. Spośród zamieszczonej literatury 94 pozycje (61%) pochodzą z lat 2014-2023. Ostatnie 15 stron pracy stanowił aneks, w którym zamieszczono 59 tabel zawierających wyniki analiz statystycznych.



Przedstawiony układ pracy jest spójny i na ogół przejrzysty. Najobszerniejszą część pracy stanowi rozdział wyniki i dyskusja, w którym szczegółowo zaprezentowano wyniki z kolejnych etapów badań powiązanych ze sobą w logiczną całość.

Jako cel pracy mgr inż. Weronika Piechowicz-Brzozowska przyjęła zbadanie wpływu szczepów drożdży i bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kapusty w trakcie kiszenia, na zawartość amin biogennych w końcowym produkcie oraz ewentualne wykorzystanie wybranych mikroorganizmów do zmniejszenia poziomu BA w kapuście kiszzonej. Cel pracy sformułowano w sposób klarowny, odzwierciedlający zadania badawcze podjęte przez Doktorantkę w części doświadczalnej. Za pozytywne uważam postawienie hipotez badawczych do których Doktorantka odnosiła się w dyskusji. Uzyskane wyniki, poddane zaawansowanej analizie statystycznej pozwoliły potwierdzić wszystkie przyjęte hipotezy badawcze.

Zakres pracy, chociaż był niezwykle obszerny, został zrealizowany w całości, zgodnie z podanymi przez Autorkę logicznie następującymi po sobie etapami. Realizacja tak szeroko zakrojonego programu badań wymagała od mgr inż. Weroniki Piechowicz-Brzozowskiej doskonałego przygotowania teoretycznego do eksperymentalnej pracy badawczej zarówno w dziedzinie mikrobiologii, biotechnologii jak i chemii, a zwłaszcza w zakresie instrumentalnych metod analizy chemicznej, umiejętności właściwej organizacji badań oraz krytycznej oceny uzyskanych wyników i ich właściwej interpretacji.

W podsumowaniu strony formalnej pracy stwierdzam, że tytuł pracy „**Wpływ mikroorganizmów wyizolowanych z kapusty w trakcie kiszenia na poziom amin biogennych**” w pełni oddaje jej treść.

### **Ocena szczegółowa pracy**

Aminy biogenne są to niskocząsteczkowe związki, które występując naturalnie w organizmach żywych (aminy endogenne) odpowiadają między innymi za regulację temperatury ciała, wydzielania kwasów żołądkowych, różnicowanie i wzrost komórek czy reakcje immunologiczne. Aminy dostarczane z pożywieniem określane są mianem egzogennych amin biogennych. W organizmie ludzkim ulegają one detoksykacji w jelicie cienkim pod wpływem enzymów, głównie monoaminooksydaz (MAO) i diaminooksydaz (DAO). Nadmierne spożycie amin biogennych może być przyczyną zatruc pokarmowych



i wywoływać niepożądane efekty. Ilość amin biogennych, która skutkuje niekorzystnymi objawami jest kwestią indywidualną i waha się w granicach od kilku  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  u osób wrażliwych do kilkuset  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  u osób zdrowych. Rozbieżności te powodują trudności w ustaleniu limitów zawartości amin biogennych w żywności. W związku z tym konieczne jest monitorowanie składu i ilości amin w produktach spożywczych. Wysoką zawartością amin biogennych, poza rybami i przetworami rybnymi, charakteryzują się produkty powstałe na skutek procesu fermentacji, takie jak alkohole, sery czy kiszone warzywa. Proces fermentacji opiera się na aktywności mikrobiologicznej głównie bakterii kwasu mlekowego (LAB). Wiele szczepów należących do tej grupy wyposażone jest w zestaw dekarboksylaz, enzymów odpowiedzialnych za przemianę aminokwasów w aminy biogenne. Histrydina, ornityna, tryptofan, tyrozyna i lizyna są przekształcane odpowiednio w histaminę, putrescynę, tryptaminę, tyraminę i kadawerynę. Na zawartość amin biogennych w produktach fermentowanych takich jak kiszona kapusta ma wpływ wiele czynników, dlatego kontrola formowania tych związków jest niezwykle trudna. Konieczne jest poszukiwanie rozwiązań, które umożliwią ograniczenie powstawania amin biogennych w procesie fermentacji. Te kwestie stały się przedmiotem badań podjętych w rozprawie doktorskiej mgr inż. Weroniki Piechowicz-Brzozowskiej. W opinii recenzenta cel badawczy niniejszej dysertacji, dotyczący określenia wpływu szczepów drożdży i bakterii fermentacji mlekowej na zawartość amin biogennych w kapuście kiszzonej jest istotny dla technologii, mikrobiologii oraz bezpieczeństwa żywności. Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera szereg elementów nowości naukowej i stanowi bardzo użyteczny wkład do wiedzy na temat fermentacji i produkcji kiszzonej kapusty.

W części teoretycznej przedstawiono dane dotyczące produkcji kiszzonej kapusty w Polsce, uwzględniając okres od 2004 do 2017 roku. Zdaniem recenzenta Autorka powinna znaleźć bardziej aktualne informacje. Następnie dość ogólnie omówiono proces produkcji kiszzonej kapusty zamieszczając w tej części schemat blokowy. W mojej opinii w tym punkcie zabrakło informacji na temat złożoności tego procesu ze szczególnym wskazaniem wpływu na przebieg fermentacji wielu technologicznych parametrów np. rodzaju naczynia, stopnia zasolenia itp. W kolejnych rozdziałach Autorka scharakteryzowała bakterie fermentacji mlekowej oraz drożdże ze szczególnym podkreśleniem ich znaczenia w produkcji kiszzonek. W ostatniej części przeglądu literatury Doktorantka scharakteryzowała aminy biogenne, zwracając uwagę na ich toksyczność oraz występowanie w żywności np.



w kapuście kiszzonej. Moim zdaniem w tej części pracy zbędna jest prezentacja wzorów strukturalnych: histaminy, tryptaminy, tyraminy, kadaweryny i putrescyny, do których zabrakło powołania w tekście i nie zostały one w żaden sposób skomentowane. W tej sytuacji odnosi się wrażenie, że ich rola polega na zwiększeniu objętości części teoretycznej pracy.

Zdaniem recenzenta treści zawarte w teoretycznej części pracy świadczą o dobrym przygotowaniu mgr inż. Weroniki Piechowicz-Brzozowskiej do realizacji etapu doświadczalnego, a przegląd literatury (aczkolwiek niezbyt obszerny) jest adekwatny do wykonywanych badań przedstawionych w dalszej części rozprawy.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka zestawiała w tabelach wykorzystane w badaniach aminokwasy oraz aminy biogenne (tab. 1), badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej (tab. 2) oraz szczepy drożdży (tab. 3). Ponadto zamieściła wykaz i charakterystykę badanych odmian kapusty (tab. 4), a następnie wykaz użytych na kolejnych etapach badań podłoży mikrobiologicznych (tab. 5) oraz aparatury badawczej. Część doświadczalna została podzielona na trzy etapy. Etap 1 obejmował badania wyizolowanych z procesu kiszenia kapusty bakterii fermentacji mlekowej względem ich zdolności do syntezy amin biogennych. Etap 2 dotyczył redukcji poziomu amin biogennych z udziałem drożdży wyizolowanych z procesu kiszenia. Etap 3 polegał na wykorzystaniu wybranych kultur drożdżowych do redukcji zawartości amin biogennych podczas kiszenia kapusty. W celu realizacji poszczególnych etapów badań Doktorantka wykorzystwała wiarygodne metody z zakresu diagnostyki mikrobiologicznej oraz nowoczesne metody analityczne takie jak oznaczenie zawartości amin biogennych, cukrów i kwasów organicznych metodą HPLC oraz analizę związków lotnych metodą SPMNE-GC-TOFMS. Niedopatrzaniem wydaje się być brak odnośników literaturowych do użytych metod chromatograficznych. Nie sądzę, aby to były opracowania autorskie. Wszystkie eksperymenty prowadzono w trzech powtórzeniach, a wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z zaznaczonymi odchyleniami standardowymi. W interpretacji wyników pomocna była analiza wariancji, test post hoc Tukey’a oraz analiza głównych składowych PCA.

Zdaniem Recenzenta dobór metod badawczych był właściwy do zadań jakie wyznaczyła sobie Doktorantka w części doświadczalnej. Stosowanie tak różnorodnych metod biologicznych i zaawansowanych technik chromatograficznych wymagało od mgr



inż. Weroniki Piechowicz-Brzozowskiej wszechstronnego przygotowania z zakresu mikrobiologii, biochemii i analizy instrumentalnej, czemu dała wyraz w dalszej części recenzowanej rozprawy.

Rozdział 6 poświęcony wynikom i dyskusji zawiera bardzo obszerną dokumentację rezultatów kolejno przeprowadzonych eksperymentów. Pierwszy etap badań posłużył Autorce do sprawdzenia potencjału bakterii fermentacji mlekowej do wytwarzania amin biogennych. W wyniku przeprowadzonych analiz z użyciem testu płytkowego z purpurą bromokrezolową jako wskaźnikiem zmiany pH z 57 szczepów bakterii wytypowano 25 potencjalnie wytwarzających aminy biogenne. Stwierdzono także, że izolaty *Leuconostoc mesenteroides* nie produkowały badanych BA. Poza skринingiem szczepów bakterii kwasu mlekowego Autorka zbadała stopień wykorzystania aminokwasów i tworzenie amin biogennych w trakcie wzrostu w podłożach modelowych. Na tej podstawie wykazała, że 11 szczepów odznaczało się niewielką produkcją histaminy. Kadaweryna została wytworzona w 18 próbkach, 9 izolatów LAB wyprodukowało tyraminę, 7 putrescynę oraz żaden badany szczep nie wytworzył tryptaminy.

W następnym etapie mgr inż. Weroniki Piechowicz-Brzozowska sprawdziła czy wyizolowane z procesu kiszenia kapusty szczepy drożdży mogą zmniejszać ilość amin biogennych. Doktorantka wykazała, że wszystkie z nich odznaczały się taką zdolnością. Wątpliwość recenzenta budzi koncepcja wytypowania do dalszych badań 7 szczepów z wykluczeniem dwóch (*Candida sake* 9 oraz *Debaryomyces hansenii* 22), które również charakteryzowały się dużym potencjałem redukcji amin biogennych. Na przykład zgodnie z wynikami przedstawionymi w tabeli 12 szczep *Debaryomyces hansenii* 22 tryptaminę zużywał w 100%, a putrescynę w 98,1%. W recenzowanej rozprawie nie znalazło się wytłumaczenie dlaczego z niego zrezygnowano. W tym miejscu nasuwa się jeszcze pytanie, czy na zróżnicowany stopień redukcji amin biogennych przez poszczególne szczepy drożdży nie miał wpływu brak standaryzacji liczby komórek jako materiału wsiewnego?

W dalszej części badań analizowano przebieg fermentacji podczas kiszenia kapusty z dodatkiem amin biogennych i z udziałem wytypowanych siedmiu szczepów drożdży. Autorka potwierdziła potencjał badanych szczepów oraz wskazała dwa szczepy (*Clavispora lusitaniae* 16 i *Debaryomyces hansenii* 17) charakteryzujące się najwyższym stopniem utylizacji BA, bez wpływu na charakterystykę otrzymanego produktu. W ostatnim



doświadczeniu przeprowadzono badanie wpływu odmiany kapusty (Galaxy, Ambrosia oraz Kamienna Głowa) i dodatku wybranych kultur drożdży na zawartość amin biogennych w kiszzonej kapuście. Na podstawie uzyskanych wyników oraz przeprowadzonej analizy głównych składowych PCA Doktorantka wykazała, że wpływ na zawartość amin biogennych w końcowym produkcie ma zarówno wykorzystana odmiana kapusty, jak również użyte do jej odfermentowania drożdże. Interesujące i wartościowe są też wyniki identyfikacji i oznaczeń wielu związków lotnych, które determinują cechy sensoryczne końcowego produktu. W badanych próbach Autorka oznaczyła zawartość: alkoholi (15 związków), estrów (19 związków), ketonów (2 związki), kwasów (3 związki), fenoli (2 związki), nitryli (5 związków), związków karbonylowych (4 związki) oraz związków siarki (7 związków). Ponadto Doktorantka stwierdziła, że odfermentowanie nastawów kapusty z dodatkiem drożdży nie wpływa znacząco na profil tych związków, a kluczowe znaczenie ma odmiana wykorzystanej kapusty. W tym miejscu w toku dyskusji rezultatów badań należałoby wspomnieć o zależności od czynników agrotechnicznych. Powstaje także pytanie, czy Autorka widzi perspektywę wykorzystania tych wyników w celu profilowania cech smakowo-zapachowych produktu końcowego.

Pani mgr inż. Weronika Piechowicz-Brzozowska w sposób wnikliwy podsumowała efekty badań, a dyskusja wyników przeprowadzona została w konfrontacji danych literaturowych z wynikami badań własnych.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka sformułowała 7 oryginalnych spostrzeżeń i wniosków. W opinii recenzenta są one prawidłowe, oparte o rezultaty uzyskane w części doświadczalnej, wolne od nieistotnych szczegółów i zawierające najważniejsze konkluzje wynikające z treści pracy.

Z obowiązku recenzenta pragnę jeszcze zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia i niejasności formalne:

1. W punktach 5.4.2 oraz 5.4.3, które dotyczyły kolejno: badania wpływu wybranych izolatów bakterii kwasu mlekowego pochodzących z kiszzonej kapusty na tworzenie amin biogennych oraz badania zdolności drożdży do wykorzystania amin biogennych w podłożu modelowym YNB z ich dodatkiem, powinna być przeprowadzona standaryzacja inokulum.



2. W punkcie 5.4.6. nie wyjaśniono w jaki sposób ustalano poziom drożdży, aby wynosił on  $10^8$  komórek/kg.
3. Na rysunku 20 prawidłowa nazwa osi rzędnych powinna brzmieć „Ubytek masy fermentującej kapusty [%]”, zamiast „Masa fermentującej kapusty [%]”
4. Nieliczne błędy edytorskie np. literówki na stronach 78, 103, 113, brak kursywy – str. 126, (p.70), str. 130 (p.120), sporadycznie błędy stylistyczne np. na stronie 42 - ostatni akapit: „wskaźnik ten obliczono jako stosunek ilości drobnoustrojów w dniu zaszczepienia do liczebności w ostatnim dniu hodowli” wymaga przerezegowania, ponieważ określenie ilość używamy w odniesieniu do rzeczowników niepoliczalnych, natomiast liczba powinna być używana przy rzeczownikach policzalnych.
5. Przy wykazie źródeł internetowych powinna być zamieszczona data ich pobrania.

Niniejsze uwagi zupełnie nie umniejszają wartości rozprawy jako całości. Pracę oceniam zdecydowanie pozytywnie, mając jednocześnie nadzieję, że moje sugestie będą użyteczne przy planowaniu kolejnych eksperymentów oraz opracowaniu publikacji.

### Podsumowanie

Recenzowana praca doktorska **mgr inż. Weroniki Piechowicz-Brzozowskiej pt.: „Wpływ mikroorganizmów wyizolowanych z kapusty w trakcie kiszenia na poziom amin biogennych”** stanowi istotny wkład w rozszerzenie wiedzy na temat możliwości wykorzystania drożdży w technologii produkcji kiszzonej kapusty. W sposób szczególny podkreślam bardzo szeroki zakres pracy i jej wielowątkowość, co niewątpliwie wymagało bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego i przygotowania teoretycznego Doktorantki.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska prezentuje ponadprzeciętne walory, głównie ze względu na poziom merytoryczny badań oraz ciekawe opracowanie wyników doświadczeń. Uznanie budzi zarówno logiczna sekwencja badań bardzo złożonego modelu doświadczalnego, jak i dociekliwość naukowa Doktorantki. Ponadto rezultaty przeprowadzonych badań odznaczają się wysokim potencjałem aplikacyjnym i powinny być wykorzystane w praktyce przemysłowej.



**Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Weroniki Piechowicz-Brzozowskiej spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki i wnioskuję o dopuszczenie jej Autorki do publicznej obrony oraz dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*E. Piątek*