



Prof. dr hab. inż. Tadeusz Tuszyński

Kraków 31.08.2022

Krakowska Wyższa Szkoła Promocji Zdrowia

Al. Grottgera 1/5

30 – 035 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Szymona Strnada pt. „ Charakterystyka mikrobioty drożdżowej obecnej podczas fermentacji kapusty głowiastej białej (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*)”

Praca została zrealizowana w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie

Promotor : prof. dr hab. inż. Paweł Satora

SYLWETKA DOKTORANTA

Pan mgr inż. Szymon Strnad urodził się w Krakowie i ukończył w 2009 roku Liceum Ogólnokształcące im. Jana III Sobieskiego o profilu biologiczno – chemicznym, zdając rozszerzone egzaminy z biologii, chemii i języka angielskiego. W tym samym roku podjął stacjonarne studia inżynierskie na Wydziale Ogrodniczym Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, Specjalność Bioinżynieria. Pracę inżynierską pt. „ Optymalizacja warunków hodowli drożdży niekonwencjonalnych pozyskanych ze środowiska”, wykonał pod kierunkiem dra hab. Pawła Kaszyckiego. W trakcie studiów inżynierskich zdobył wyróżnienie na Wydziałowej Sesji Kół Naukowych, za pracę poświęconą mikrobiocie drożdżowej z boczny wulkanu Wezewiusz. Po ukończeniu studiów I stopnia w 2013 roku, kontynuował studia II stopnia na międzywydziałowym kierunku Biotechnologia, specjalność Biotechnologia roślin,

zakończone pracą dyplomową pt. „ Bioremediacja zanieczyszczeń węglowodorowych przez wyizolowane ze środowiska drożdże niekonwencjonalne”, wykonaną również pod kierunkiem dra hab. Pawła Kaszyckiego. Studia magisterskie ukończył w 2014 roku i rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Technologii Żywności UR w Krakowie, które na wniosek Doktoranta zostały przedłużone o 1 rok. Podczas realizacji pracy doktorskiej prowadził okresowo ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii żywności i był wykonawcą projektu NCN, pt. „, Utylizacja amin biogennych powstałych w odciekach z fermentacji kapusty przez mikroorganizmy wyizolowane podczas tego procesu”. Kierownikiem projektu był prof. dr hab. inż. Paweł Satora. Po ukończeniu studiów, zdał ustawowe egzaminy i przedłożył, Przewodniczącemu Rady Dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia UR w Krakowie, prace doktorską do dalszego procedowania.

OGÓLNA OCENA PRACY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera 297 stron, w tym przegląd literatury zajmuje 38 stron, cel pracy, hipotezy badawcze oraz materiał i metody 17 stron, wyniki i dyskusja oraz wnioski 135 stron, bibliografia i załączniki łącznie 99, a 10 stron zajmuje spis treści, abstrakty i podziękowania.

W części doświadczalnej zamieszczono 20 tabel i 71 rysunków oraz 71 tabel i 12 rysunków w formie załączników.

Końcowa część opracowania obejmuje 9 wniosków i 264 pozycje dobrze dobranej literatury, w tym około 90% z obiegu międzynarodowego, a ponad 50% pozycji z ostatnich 10 lat.

Rozprawa dotyczy bardzo szerokiego spektrum zagadnień ukierunkowanych na biotechnologiczne, a szczególnie mikrobiologiczne aspekty kiszenia kapusty głowiastej białej (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*).

Należy zaznaczyć, że Polska, w tym głównie niektóre regiony na Pomorzu, w powiecie kołobrzeskim i koszalińskim oraz miechowskim słyną z uprawy i przetwórstwa kapusty. Gmina Charsznica w Małopolsce jest uznana za „kapuścianą stolicę Polski”, a kiszona kapusta z tej gminy została wpisana na krajową listę produktów tradycyjnych. W Charsznicy powstało

również, chyba jedyne w świecie, muzeum poświęcone kapuście. Należy zatem uznać, że bardzo zasadne jest szersze zainteresowanie naukowe tym tradycyjnym, polskim produktem.

Zainteresowania naukowe Doktoranta były i są ściśle ukierunkowane na wszystkich etapach nauczania i badań, i mieszczą się w obszarze mikrobiologii środowiskowej, przemysłowej oraz biotechnologii i bioprocessów.

Zrealizowane w ramach pracy doktorskiej doświadczenia ujmują bardzo szeroki zakres czynników i parametrów kiszenia kapusty, a oceniana i analizowana liczba prób jest co najmniej ponadnormatywna. Należy zaznaczyć, że procedury postępowania i metody analityczne w mikrobiologii są pracochłonne i czasochłonne, a często też niełatwe do precyzyjnego opanowania i wykonania. Całość badań i przygotowane opracowanie są godne podziwu, szczególnie pod względem wielowątkowej koncepcji, liczby badanych czynników i wykonanych oznaczeń oraz rozbudowanej analityki i jej pracochłonności.

OCENA MERYTORYCZNA

Wykorzystanie drobnoustrojów do biosyntezy i biotransformacji, ale także tradycyjnej modyfikacji żywności z jednoczesnym podwyższeniem jej stabilności jest ciągle aktualne. Coraz doskonalsze metody analityczne pozwalają dokładniej identyfikować komórki i zmiany w środowisku jakie następują przy ich udziale, a następnie opisać i w pełni świadomie, w sposób optymalny wykorzystać ogromny potencjał drobnoustrojów w procesach technologicznych.

W części teoretycznej opracowania Autor w sposób kompetentny przedstawił przegląd literatury światowej i krajowej, dotyczącej tematu pracy i zagadnień bliskoznacznych. Zawarte treści, jak też cytowana literatura naukowa i jej interpretacja świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Kandydata do podjęcia badań dotyczących aspektów mikrobiologicznych i technologicznych kiszenia kapusty. Przegląd bardzo liczny, dobrze dobranej piśmiennictwa był podstawą do sformułowania celu pracy, który został przedstawiony w sposób logiczny – bez istotnych zastrzeżeń.

W tej części opracowania Autor zamieścił m.in. 23 rysunki, które obrazują podstawy teoretyczne i praktykę kiszenia kapusty.

Głównym celem przedstawionej do oceny pracy była charakterystyka drożdży obecnych w procesie kiszenia kapusty z określeniem ich składu ilościowego i jakościowego oraz wpływu wyizolowanych kultur na przebieg procesu fermentacji, skład chemiczny i jakość końcowego produktu.

Materiałem do badań była kapusta pięciu odmian pozyskanych z hodowli w Charsznicy. Odmiany do badań zostały wytypowane na podstawie literatury, ich wczesności, pośrednio również zawartości cukrów oraz zaleceń hodowców i aktualnej dostępności surowca na rynku (s.51). Na stronie 66 zapis powyższy został nieco zmodyfikowany, cytuję „, do badań wybrano pięć późnych odmian kapusty, pochodzących z okolic małopolskiej Charsznicy, dostępnych na rynku w czasie wykonywania badań i wskazanych przez plantatorów oraz producentów kiszzonek”.

Fermentacje 5 odmian kapusty były przeprowadzone w naczyniach szklanych (słoje) i garnkach kamionkowych, do których odważono po 4 kg kapusty (s.54-55). Wydaje się, że bardziej odpowiednimi określeniami byłyby pojemniki lub zbiorniki. Brak informacji czy kapusta w pojemnikach kamionkowych, po obciążeniu kamieniem dociskowym była zakryta pokrywą, a kołnierz zbiornika zabezpieczony wodą. Nie zapisano też w jaki sposób, po zabezpieczeniu słoja zakrętką, zalewano ją wodą (s. 55).

W kolejnym etapie badań, dotyczącym m.in. wpływu kultury drożdży na tworzenie związków lotnych, doświadczenia wykonywano w skali mikrolaboratoryjnej z odmianą kapusty Galaxy, wybraną na podstawie uprzednich badań.

W części doświadczalnej Autor opisał układ badań i ich przebieg oraz metody analityczne. Na podkreślenie zasługuje właściwy dobór wiarygodnych, nowoczesnych metod o zaawansowanych procedurach, szczególnie z zakresu biologii molekularnej m.in. izolacja i oczyszczanie DNA badanych szczepów drożdży, amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA w celu ich identyfikacji (RAPD-PCR i PCR-RFLP). Końcowe sekwencjonowanie zostało wykonane w firmie Macrogen, w Amsterdamie.

Wyróżniają się także oznaczenia związków lotnych metodą chromatografii gazowej w nowoczesnym zestawie analitycznym SPME-GC-TOFMS. Łącznie zidentyfikowano, na podstawie widm masowych i wskaźników retencji 45 związków z grupy alkoholi, cyjanianów, estrów, fenoli i terpenów, ale też siarczków, nitryli, aldehydów i ketonów. Wszystkie

oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z zaznaczonymi odchyleniami standardowymi. W interpretacji wyników pomocna była analiza wariancji, testy Duncana i t-studenta oraz rachunek prawdopodobieństwa opisany tzw. centralnym twierdzeniem granicznym.

W bardzo obszernym rozdziale „Wyniki i dyskusja” (133 strony, w tym 71 rysunków i 19 tabel) przedstawiono, w sposób wyjątkowo przejrzysty i wyczerpujący. Pełna dokumentacja rezultatów z kolejno przeprowadzonych badań i oznaczeń, tworzy logiczny ciąg wieloaspektowej całości. Nie wnoszę zastrzeżeń do metod analitycznych, formy prezentacji wyników, ich analizy statystycznej i większości interpretacji.

Za bardzo interesujące i wartościowe można uznać wyniki identyfikacji i oznaczeń wielu związków lotnych, które mogą współtworzyć lub zmieniać cechy sensoryczne końcowego produktu. Bacząc na bogaty skład chemiczny kiszonki, można planować dalsze badania określające wzajemne interakcje komponentów i ich wpływ na końcową jakość kiszonej kapusty. Dobrze zobrazowane i wartościowe są także wyniki opisujące tworzenie i metabolizm kwasu mlekowego i octowego, ale także wykorzystania cukrów podczas wzrostu bakterii i drożdży. Ten obszar wymagałby jednak dalszych, bardziej szczegółowych, modelowych doświadczeń. Ważną częścią badań są wyniki selekcji i identyfikacji szczepów drożdży, w tym rodzaju *Debaromyces* i *Rhodotorula*, jako dominujących w badanym procesie kiszenia. Wyodrębniono 6 szczepów o wysokiej (98%) identyczności. W innym obszarze badań dotyczących metabolizmu różnych źródeł węgla, zróżnicowano populację drożdży na kultury glukozowo- i fruktozo-filne. Chciałbym podkreślić, że znaczna część otrzymanych w pracy wyników ma też wartość użyteczną, które mogą się przyczynić do dalszej optymalizacji procesu kiszenia kapusty.

Zakończeniem recenzowanego opracowania jest 9 wniosków, które odnoszą się do wykonanych badań i zaprezentowanych wyników, i nie wykraczają poza ich obszar. W opinii recenzenta wnioski ujmuje najważniejsze konkluzje, szczególnie technologiczne, wynikające z przeprowadzonych doświadczeń. Po ewentualnych, dalszych eksperymentach, w skali makrolaboratoryjnej lub półtechnicznej, celowe byłoby sformułowanie końcowego wniosku skierowanego do praktyki przemysłowej.

Na koniec kilka uwag i refleksji o charakterze dyskusyjnym oraz przykładowe, zauważone błędy, które nie wpływają na naukowy poziom pracy.

- Badania bardzo obszerne, wielowątkowe, o dużej liczbie zmiennych, niełatwe do interpretacji i oceny. Wydaje się, że niektóre zadania można było pominąć bez szkody dla wartości naukowo – badawczej całej pracy, np. wpływ wybranych naczyń użytych do fermentacji (lepiej pojemników lub zbiorników) na mikrobiotę drożdżową i skład chemiczny kiszonki. Zbiorniki kamionkowe, a szczególnie szklane nie są używane do kiszenia kapusty w skali przemysłowej, raczej w warunkach domowych. Taką refleksję mam również do badania wzrostu 10 izolatów drożdży w 4 różnych temperaturach i 4 różnych stężeniach chlorku sodu.
- Wydaje się, że należy zachować większą ostrożność przy interpretacji wpływu drożdży na metabolizm niektórych kwasów organicznych, szczególnie kwasu octowego, jak również w badaniach ich wpływu, jako kultury towarzyszącej bakteriom kwasu mlekowego, na procesy metabolizmu i skład chemiczny kiszonki, chociażby z uwagi na znacząco różny okres generacji tych kultur.
- Sporadyczne błędy interpunkcji, stylistyczne i innej natury, np. „wyniki jasno mówiły (s.21), czy bakterie posiadały (s.25)”- posiadaczem może być tylko istota rozumna.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że Pan mgr inż. Szymon Strnad w pełni zrealizował postawione w pracy doktorskiej cele i zadania badawcze, wykazał się dużą wiedzą i umiejętnością prowadzenia wielu złożonych, pracochłonnych i czasochłonnych doświadczeń i procedur analitycznych oraz wysoką dojrzałością naukowo – badawczą.

Oceniana rozprawa zawiera elementy oryginalności i jest cennym wkładem w poszerzaniu wiedzy, w zakresie identyfikacji i roli różnych szczepów drożdży, w procesie kiszenia kapusty. Uznaję z pełnym przekonaniem, że praca doktorska Pana mgr inż. Szymona Strnada spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku, o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dziennik Ustaw z 2017 roku, w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, i wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Szymona Strnada do publicznej obrony.

