

Prof. dr hab. inż. Henryk Jeleń
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Ul. Wojska Polskiego 31, 60-624-Poznań
Tel: 061-8487273
E-mail: henryk.jelen@up.poznan.pl

Poznań, 06.01.2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Olgi Świder pt. „Wpływ modyfikacji mikrobioty na obecność amin biogennych w fermentowanej żywności” realizowanej pod kierunkiem dr hab. inż. Marka Ł. Roszko, prof. IBPRS-PIB.

Podstawą do wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej nr X/74/2023 IBPRS z dnia 16.08.2023 r powołująca niżej podpisanego na recenzenta. Pismo z powyższą informacją zostało wysłane w dniu 06.11.2023. Praca doktorska była realizowana w Zakładzie Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno – Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowym Instytucie Badawczym (IBPRS-PIB).

Wybór tematyki pracy

Występowanie w żywności amin biogennych jest zagadnieniem istotnym przede wszystkim z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności, w aspekcie ich negatywnego oddziaływania na ludzki organizm. Tematyka związana z aminami biogennymi jest dość popularna w badaniach żywności – liczba publikacji z aminami biogennymi w tytule wg Web of Science to ponad 5000 prac (w tym 220 przeglądowych), a aminy biogenne w temacie pracy to ponad 14 000 publikacji, w tym 1325 prac przeglądowych. „Biogenic amines AND food” (w temacie) to 5300 publikacji, a „biogenic amines AND fermented food” to 1421 publikacji, w tym 151 prac przeglądowych. Jak widać jest to tematyka, biorąc pod uwagę niewielką liczbę związków wchodzących do tej grupy, dość mocno eksplorowana. Najczęściej obiektem zainteresowania jest tworzenie amin biogennych i ich analityka w produktach mięsnych, serach, winach, a także produktach fermentowanych. Od strony analitycznej oznaczanie amin biogennych opiera się głównie na chromatografii cieczowej, a metody derywatacji grupy aminowej pozwalają na monitorowanie zarówno amin, jak i ich prekursorów – wolnych aminokwasów i zapewniają dobrą selektywność stosowanych metod.

Procesy fermentacyjne należą do tych w technologii żywności, które sprzyjają powstawaniu amin biogennych. Wykorzystanie w tych procesach kultur starterowych, które nie wykazują

zdolności do tworzenia amin biogennych może się przyczynić do obniżenia zawartości tych związków w produktach fermentowanych. Poznanie dynamiki tworzenia amin biogennych i profilu mikroorganizmów w czasie fermentacji warzyw zawiera cenne aspekty poznawcze i aplikacyjne. Temat badań podjęty w rozprawie, dotyczący ryzyka zdrowotnego związanego z obecnością amin biogennych w warzywach fermentowanych i modyfikacją mikrobioty żywności w celu ograniczenia ich tworzenia uważam za bardzo ciekawy i ważny z punktu widzenia zarówno mikrobiologii, chemii żywności, żywienia człowieka, jak i bezpieczeństwa żywności.

Praca ma formę kompilacji 4 publikacji, które ukazały się w latach 2020 – 2023 w następujących czasopismach: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Molecules*, *LWT-Food Science and Technology*, oraz *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*:

[P1] Świder, O., Roszko, M.Ł., Wójcicki, M., Szymczyk, K. (2020) Biogenic amines and free aminoacids in traditional fermented vegetables – dietary risk evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(3), 856-868. IF₂₀₁₉ = 4.192, MNiSW/MEiN₂₀₁₉ = 140pkt.

[P2] Świder, O., Wójcicki, M., Bujak, M., Juszczuk-Kubiak, E., Szczepańska, M., Roszko, M.Ł. (2021) Time evolution of microbial composition and metabolic profile for biogenic amines and free aminoacids in a model cucumber fermentation system brined with 0.5% to 5.0% sodium chloride. *Molecules*, 26(19), 5796. IF₂₀₂₁ = 4.927, MNiSW/MEiN₂₀₂₁ = 140pkt.

[P3] Świder, O., Roszko, M.Ł., Wójcicki, M., Bujak, M., Szczepańska, M., Juszczuk-Kubiak, E., Średnicka P., Cieślak, H. (2023) Non-aminobiogenic starter cultures in a model system of cucumber fermentation. *LWT – Food Science and Technology*, 177, 114574. IF₂₀₂₃ = 6.056, MNiSW/MEiN₂₀₂₃ = 100pkt.

[P4] Świder, O., Roszko, M., Wójcicki, M. (2023) The inhibitory effects of plant additives on biogenic amine formation in fermented foods – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-26. IF₂₀₂₂ = 10.2, MNiSW/MEiN₂₀₂₃ = 200pkt.

Trzy pierwsze publikacje mają charakter prac eksperymentalnych, czwarta jest pracą przeglądową. Sumaryczny IF prac wchodzących w zakres cyklu wynosi 25.375, sumaryczna liczba punktów wg wykazu czasopism MNiSW/MNiE wynosi 580.

Opis wkładu Doktorantki w realizację badań ujętych w pracy (zamieszczony na str. 17-18 rozprawy), oraz oświadczenia współautorów publikacji, zamieszczone w końcowej części rozprawy jednoznacznie wskazują na wiodący udział Doktorantki w wykonaniu, eksperymentów, zebraniu, analizie i interpretacji danych oraz pisaniu manuskryptów w/w publikacji.

Układ pracy doktorskiej

Tytuł pracy to „Wpływ modyfikacji mikrobioty na obecność amin biogennych w fermentowanej żywności”. Biorąc pod uwagę charakter pracy opublikowanej w [P1], a także [P2] myślę, że tytuł mógł nie zawierać słowa „modyfikacja”.

Praca obejmuje 207 stron maszynopisu. Został on podzielony na kilka głównych elementów: Przegląd piśmiennictwa (str. 19-35); Hipotezy, cel i zakres pracy (str. 35-37); Materiał i metody badań (str. 37-41); Omówienie i dyskusja wyników (str. 41-54); Podsumowanie i wnioski (str. 54-58); Spis literatury (58-69). Do pracy dołączono kopie publikacji (str. 69-181) z materiałami dodatkowymi oraz oświadczenia współautorów publikacji i wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki.

W przeglądzie piśmiennictwa po krótkiej charakterystyce produktów fermentowanych omówiono występowanie amin biogennych (BA) w żywności, ich wpływ na organizm człowieka, aspekty bezpieczeństwa żywności i prawodawstwa odnoszące się do amin biogennych. Dość wyczerpująco omówiono także metody obniżenia zawartości BA w żywności fermentowanej, w tym modyfikację temperatury, stężenia NaCl, zastosowanie kultur starterowych oraz dodatków roślinnych. Całość jest zwarta i dobrze napisana, stanowi dobre wprowadzenie do tematyki. Nadmienić trzeba, że ostatnia publikacja (przeładowa) wchodząca w zakres pracy doktorskiej jest cennym uzupełnieniem części literaturowej rozprawy. Według mnie praca ta powinna rozpoczynać, a nie zamykać cykl publikacji.

W pracy przedstawiono 3 hipotezy badawcze, które w zasadzie pokrywają się z głównymi wnioskami płynącymi z publikacji – że między innymi; *i*) fermentowane produkty warzywne cechuje wysoka zawartość amin biogennych; *ii*) modyfikacja warunków fermentacji wpływa na mikrobiotę żywności i zawartość amin biogennych w fermentowanych produktach warzywnych, oraz; *iii*) zastosowanie LAB nie posiadających zdolności do produkcji amin biogennych jako kultury starterowej do fermentacji warzyw obniża zawartość tych związków. Przedstawiono także bardzo dobrze opisany cel pracy i jej zakres.

W części Materiały i metody przedstawiono w skrócie procedury technologiczne i metody analizy chromatograficznej oraz mikrobiologicznej użytych w badaniach. W celu dokładniejszego poznania procedur analitycznych czytelnik musi się odwołać do publikacji. Za wyjątkiem sekwencjonowania amplikonów i analizy bioinformatycznej przedstawionych w pracy [P2], a także identyfikacji kultur starterowych [P3], badania wykonano w pracowniach Instytutu. Nieprecyzyjna jest informacja dotycząca miejsca wykonania analiz genów odpowiedzialnych za produkcję BA.

Cykl prac otwiera praca [P1] – “Dietary amines and free amino acids in traditional fermented vegetables – dietary risk evaluation” w *J. Agric. Food Chem.* Publikacje w tym, w mojej opinii, najbardziej renomowanym czasopiśmie z zakresu chemii żywności poddawane są bardzo wnikliwej procedurze recenzji (zazwyczaj jest to 5 recenzentów), aczkolwiek nie zwalnia mnie to z obowiązku wyrażenia swoich uwag. W pracy zbadano obecność 9 amin biogennych i 8 wolnych aminokwasów będących ich prekursorami w 85 próbkach 19 warzywnych produktów fermentowanych obecnych na polskim rynku. Do oznaczania w/w związków za pomocą LC-MS wybrano metodę z derywatyzacją za pomocą chlorku dansylu, która umożliwiła dołączenie chromofora do grupy aminowej cząsteczki aminy, czy aminokwasu (istotne szczególnie w klasycznej (DAD/FLD) detekcji w HPLC) oraz poprawia właściwości retencyjne oznaczanych związków w odwróconym układzie faz. To jedna z najpowszechniej, o ile nie najpowszechniej używana metoda derywatywacji do tego typu oznaczeń. Analizy prowadzono za pomocą zestawu HPLC wyposażonego w spektrometr mas z analizatorem kwadropolowym i spektrometrem czasu przelotu wysokiej rozdzielczości (Q-TOF). Dla opracowanej metody podano wybrane jej charakterystyki – odzyski na dwóch poziomach wzbogacenia (10 i 25mg/kg), powtarzalność, granice oznaczalności (LOQ) i wykrywalności (LOD). W moim odczuciu brakuje liniowości metody (R²) i zakresu stężeń wykorzystanych do tworzenia krzywych standardowych, a także chromatogramów (lub przynajmniej czasów retencji) z rozdziału standardów oznaczanych związków i obecnych w wybranych próbkach.

Najwyższymi zawartościami BA cechowały się kiszona brukselka, kiszone brokuły, Kimchi, kiszone ogórki i kiszona biała kapusta. Dominującymi BA w badanych próbkach były: putrescyna (42%), tyramina (20%) i kadaweryna (18%). Jak zauważyła autorka wysokie poziomy amin biogennych w brukselce, brokułach i pozostałych warzywach krzyżowych związane są z wysoką zawartością wolnych aminokwasów. Autorzy pokusili się o określenie spożycia amin biogennych (BAI), mogącego wpływać negatywnie na zdrowie, które zawarto w Tabeli 4. W oparciu o wcześniejsze prace do tej klasyfikacji wliczono zawartość histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny, autorzy wzięli pod uwagę także dodatkowe czynniki związane ze spożyciem BA. Klasyfikacja ta stanowi cenną informację w szacowaniu ryzyka związanego ze spożyciem BA, aczkolwiek w opisie samej Tabeli 4 z punktu widzenia edytorskiego brakuje rozwinięcia skrótu BAI oraz jednostek.

Praca stanowi cenne kompendium na temat występowania amin biogennych w fermentowanych produktach warzywnych, co z pewnością uzupełnia naszą wiedzę na ten temat. Dowodem na istotność tej publikacji dla naukowców zajmujących się tematyką amin biogennych jest jej znaczna liczba cytowań - 38 na dzień pisania recenzji (WoS, Core Collection).

Druga praca [P2] dotyczy dokładnej charakterystyki zmian zachodzących w czasie produkcji ogórków kiszonych w różnych wariantach. Warianty różniły się wyjściową zawartością chlorku sodu w zalewie (0.5, 1.5 i 5.0%). Monitorowano w pracy zarówno zmiany pH, jak i zmiany w mikrobiomie w czasie fermentacji, obejmujące log CFU/mL dla LAB, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* i grzybów. Określono także profil bakterii w ogórkach kiszonych przechowywanych przez 6 miesięcy w różnych wariantach temperatury i zawartości NaCl. Określono także zmiany zawartości amin biogennych (histaminy, putrescyny, tyraminy, kadaweryny, spermidyny, sperminy i agmatyny), oraz wybranych aminokwasów i wybranych kwasów organicznych w czasie 6 miesięcy dla różnych wariantów kiszenia.

W tej pracy autorzy odwołują się do omawianego w poprzedniej pracy konceptu BAI, według którego ogórki po 10 dobach fermentacji stanowią niskie ryzyko. Umiarkowane zagrożenie (BAI > 150mg/kg) zidentyfikowano przy wybranych warunkach przechowywania (4 miesiące, ale także 144 i 192 godziny fermentacji). Najmniejsze zawartości BAI zanotowano po 6 miesiącach przechowywania kiszonych ogórków, bez względu na wariant oświadczenia. W przetestowanych wariantach doświadczeń, obejmujących różne temperatury i stężenia soli w zalewie okazało się, że nie ma jednoznacznych zależności pomiędzy ilością tworzonych amin biogennych czy aminokwasów a czasem fermentacji i ilością NaCl w zalewie. Wyższe zawartości BAI generalnie notowano dla wyższej temperatury fermentacji/przechowywania. W pracy wykonano bardzo złożone badania mikrobioty procesu fermentacji oparte na identyfikacji genetycznej (w oparciu o regiony V3-V4 genu 16S rRNA) - wykonane przez jednostkę zewnętrzną. Niewiele wynika według mnie z profilowania metabolitów z użyciem HRMS (Orbitrap). W pracy, w materiałach dodatkowych zamieszczono bardzo dużo wyników, rozumiem, że w celu pełnego udokumentowania procesów i ułatwienia dokładniejszej wizualizacji danych zamieszczonych w formie wykresów. Nie wiem, czy dla prowadzących badania w tym kierunku wystarczającym wynikiem nie jest Ryc. 3 z pominięciem szczegółów zamieszczonych w 17-stronicowej Tabeli S28. Fig. S1 (Volcano plots) oraz Fig. S2 wskazują na różnice w metabolomie przy różnych wariantach fermentacji, natomiast analiza metabolomiczna tych procesów mając do dyspozycji tak dobre narzędzie, jakim jest w/w HRMS z odpowiednim oprogramowaniem zasługiwałaby na oddzielną publikację. W tej formie nie wnosi wiele do otrzymanych wyników.

Za cenne w tej pracy natomiast uważam dane dotyczące zmian zawartości poszczególnych grup mikroorganizmów w czasie 10 dni fermentacji, charakterystykę profilu bakterii po różnych wariantach fermentacji i przechowywania oraz zmian BA dla tych wariantów.

Publikacja [P3] dotyczy wykorzystania kultur starterowych, cechujących się niską zdolnością do tworzenia BA (*Lactocaseibacillus casei* KKP 3272 oraz *Pediococcus pentosaceus* KKP 3273) do fermentacji ogórków (rozdrobionych) w układzie modelowym w odniesieniu do

standardowej (spontanicznej) fermentacji. Kultury starterowe pochodzące z kolekcji Instytutu zostały scharakteryzowane metodami molekularnymi. Podobnie jak w pozostałych pracach monitorowano za pomocą LC-MS/MS z wykorzystaniem aparatu Q-Exactive zawartość amin biogennych i wolnych aminokwasów. Za pomocą HPLC monitorowano także kwasy organiczne. Określono podstawowe dekarboksylazy katalizujące tworzenie amin biogennych z odpowiednich aminokwasów na podstawie analizy genów je kodujących. Poziom tworzonych BA zależny był od liczby komórek bakteryjnych w wyjściowej kulturze starterowej. Główne aminy – histydyna, tyramina, putrescyna, kadaweryna oraz spermina dominowały wśród oznaczanych, a ich stężenia przy liczbie CFU 10^4 były podobne do stężeń w spontanicznej fermentacji wskazując, że kultury starterowe nie zdołały zdominować mikrobioty w procesie fermentacji. Dopiero stężenia rzędu 10^7 CFU dawały wyraźnie niższe poziomy oznaczanych amin biogennych. Po 6 miesiącach przechowywania zbadano profil bakterii w badanych wariantach prób. Dane te są bardzo interesujące, jednoznacznie wskazując na zmianę profilu mikroorganizmów wynikający ze zróżnicowania stężeń kultur starterowych. Cennym uzupełnieniem tej bardzo ciekawej i wartościowej pracy byłaby analiza sensoryczna ogórków produkowanych przy zróżnicowanym profilu mikrobioty.

Dopełnieniem prac eksperymentalnych jest praca przeglądowa [P4] opublikowana w jednym z najwyższej notowanych czasopism publikujących prace z zakresu nauk o żywności czasopiśmie – *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Opisano w tej pracy wpływ dodatków/ekstraktów roślinnych na proces tworzenia amin w fermentowanych produktach. W pracy między innymi zajęto się rolą LAB w procesach fermentacji i tworzeniu BA, ograniczeniami i zaletami spożycia produktów fermentowanych w kontekście obecności w nich BA, przedstawiono aminy biogenne tworzone w żywności fermentowanej i ich toksyczność. Najważniejszą jednak częścią pracy stanowi omówienie metod pozwalających na obniżenie zawartości amin biogennych w produktach fermentowanych, w szczególności wpływ dodatków pochodzenia roślinnego na mikroflorę w badaniach *in vitro*, a także wpływ tych dodatków na zawartość amin biogennych w fermentowanych produktach mięsnych, rybnych, mlecznych i roślinnych fermentowanych. Nawet przy znacznej liczbie prac przeglądowych na temat amin biogennych, często bardzo do siebie podobnych, praca [P4] wnosi dużo nowych informacji, a jej struktura i ujęcie danych jest bardzo ciekawe i dostarcza wielu specjalistycznych informacji.

Podsumowując, niniejsza rozprawa stanowi bardzo jednorodne i wartościowe opracowanie przedstawiające problem tworzenia amin biogennych w fermentowanych produktach roślinnych, analizując ich zawartości w różnych produktach, a także skupiając się na układach modelowych w postaci procesu kiszenia ogórków. Zaletą cyklu prac jest wielostronna charakterystyka zachodzących procesów, uwzględniająca rolę

mikroorganizmów oraz szczegółowo charakteryzująca mikrobiom biorący udział w procesach fermentacyjnych. Oprócz zaawansowanych metod analitycznych (LC-MS/MS) oznaczania amin biogennych i ich prekursorów (wolnych aminokwasów), używano HPLC do oznaczania głównych kwasów organicznych, a ponadto szereg technik molekularnych pozwalających na charakterystykę mikroorganizmów biorących udział w opisywanych procesach.

Doktorantka w pełni zrealizowała cele stawiane w rozprawie, wykazała się dużą biegłością analityczną i umiejętnością interpretacji wyników. Pełniła kluczową rolę w realizacji wszystkich doświadczeń i tworzenia manuskryptów. Praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Biorąc powyższe pod uwagę zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno Spożywczego w Warszawie o dopuszczenie pani mgr inż. Olgi Świder do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę bardzo wyczerpującą charakterystykę wpływu mikroorganizmów na proces tworzenia amin biogennych w fermentowanych produktach roślinnych opisaną w pracach [P2] i [P3], wyczerpujący i ciekawy przegląd produktów fermentowanych scharakteryzowanych w pracy [P1], oraz bardzo dobrą i oryginalną pracę przeglądową [P4] wnoszę o wyróżnienie niniejszej pracy w stosownym trybie. Powodem do wyróżnienia oprócz merytorycznej wartości prowadzonych badań jest także jakość czasopism, w których zostały opublikowane - w szczególności prace [P1] i [P4].


Prof. dr hab. Henryk Jeleń