

Kraków, 28.08.2023 r.

Prof. dr hab. inż. Paweł Satora

Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Kamili Szudera-Kończal pt. „Wykorzystanie pleśni *Galactomyces geotrichum* do otrzymywania kompozycji aromatycznych z maślanki i serwatki. Charakterystyka związków aktywnych zapachowo w oparciu o podejście sensomiczne”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Anny Majcher w Pracowni Badania Związków Lotnych i Aktywnych Sensorycznie, Katedry Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Szacuje się, że współczesny człowiek zjada przeciętnie około 1 tony żywności rocznie, w tym około 2 kg chemicznych dodatków do żywności. Mają one za zadanie poprawić walory wizualne oraz sensoryczne produktów (barwa, aromat i smak), a także zwiększyć ich trwałość oraz ułatwić przetwarzanie. Zapotrzebowanie na aromaty systematycznie rośnie już od kilkunastu lat. Wzrost ten spowodowany jest głównie „uprzemysłowieniem” życia i zmianami w nawykach żywieniowych. Konsumenty stale są „wabieni” nowymi doznaniem smakowymi – nie tylko tymi przyjemnymi czy ekscytującymi, lecz również wynikającymi z połączenia wygody i zdrowego stylu życia czy trendu eko. Światowy rynek aromatów spożywczych jak się szacuje w roku 2023 jest wart 842,14 milionów dolarów, a w kolejnych latach ma dalej rosnać, uzyskując w 2033 roku wartość niemal 1,6 mld dolarów. Zmienia się jednakże struktura stosowanych do aromatyzowania związków. Obecnie konsumenci preferują przede wszystkim aromaty naturalne, gdyż uważają je za bezpieczne. Otrzymuje się je stosując tradycyjne metody, takie jak ekstrakcja, czy destylacja z parą wodną z materiałów roślinnych. Coraz większym zainteresowaniem cieszą się techniki biotechnologiczne.

Produkcja bioaromatów zwykle odbywa się w drodze bezpośredniego odzysku z natury, co napotyka wiele problemów, takich jak (i) niskie stężenie interesującego komponentu, co utrudnia ekstrakcję i procedury oczyszczania; (ii) zależność od czynników sezonowych, klimatycznych i politycznych; oraz (iii) możliwe problemy ekologiczne związane z ekstrakcją. Produkcja biotechnologiczna jest atrakcyjną alternatywą dla wytwarzania aromatów, ponieważ

zachodzi w łagodnych warunkach, daje pożądaną enancjomer, wymaga procesu mniej uciążliwego dla środowiska, nie generuje toksycznych odpadów, co więcej może wykorzystywać produkty uboczne po innych procesach. Wykorzystanie metod biotechnologicznych jest również interesującym podejściem do produkcji aromatów, ponieważ związki wytwarzane tą metodą definiuje się jako „naturalne” lub wytworzone w sposób naturalny. Biologiczna droga syntezy aromatów opiera się na mikroorganizmach, które produkują dane substancje „de novo” (fermentacja) lub poprzez biokonwersję naturalnych prekursorów z udziałem procesów przebiegających w komórce lub enzymów przez nią wytworzonych (biotransformacja). Najliczniejszą grupę drobnoustrojów wykorzystywanych w tym celu na skalę przemysłową stanowią drożdże oraz grzyby strzępkowe.

Jednym z mikroorganizmów, który potencjalnie może być użyty do produkcji związków aromatu, jest *Galactomyces geotrichum*, kwasoodporny grzyb drożdżopodobny, wykorzystywany jako kultura starterowa lub jako element naturalnej kultury mieszanej pochodzącej z mleka, do produkcji serów oraz niektórych tradycyjnych mlecznych produktów fermentowanych. Rozwój *G. geotrichum* jest typowy dla wielu serów dojrzewających, koagulowanych kwasem. *Galactomyces geotrichum* nadaje im charakterystyczny wygląd, smak i aromat. W serowarstwie znaczenie ma przede wszystkim jego aktywność proteolityczna i lipolityczna, katabolizm aminokwasów i wolnych kwasów tłuszczowych oraz działanie odkwaszające. Jednakże *G. geotrichum*, podobnie jak inne grzyby mikroskopowe, jest również często uważany za organizm powodujący psucie żywności. Rozwój pleśni na powierzchni serów miękkich dojrzewających prowadzi do powstania wady śliskiej skórki, a obecność w produktach mlecznych fermentowanych i serach świeżych ogranicza trwałość tych produktów.

Tematyka związana z badaniem różnych właściwości *Galactomyces geotrichum* cieszy się szczególnie w ostatnich latach bardzo dużym zainteresowaniem. W bazie Web of Science Core Collection znajduje się obecnie 2541 artykułów naukowych w tym temacie, a od roku 2016, co roku pojawia się około 100 nowych publikacji. Badania związane są głównie z obecnością tych mikroorganizmów w trakcie otrzymywania różnych produktów żywnościowych, głównie w wyniku fermentacji mlekowej, ale również z ich aktywnością enzymatyczną, czy też ich wykorzystaniem w ochronie środowiska.

Prace opublikowane przez Panią mgr Kamilę Szuderę-Kończal, wpisują się w ww. opisany trend i dostarczają nowych informacji, dotyczących produkcji związków aromatycznych o zapachu miodowo-różanym, na podłożach wykorzystujących produkty uboczne przemysłu mleczarskiego (maślance i serwatce), a także wpływu warunków hodowli i źródła węgla na biosyntezę związków zapachowych. Przedstawione wyniki badań mają duże znaczenie aplikacyjne, ze względu na możliwość wykorzystania otrzymanych kompozycji aromatycznych w przemyśle mleczarskim, ale również cukierniczym, piekarniczym, czy piwowarskim.

Jako swoje osiągnięcie naukowe do postępowania doktorskiego mgr inż. Kamila Szudera-Kończal, przedstawiła cykl składający się z 3 prac, opublikowanych w latach 2020-2023 w czasopiśmie, znajdujących się w bazie JCR, to jest w wydawanym przez ACS Publications – Journal of Agricultural and Food Chemistry oraz MDPI – Molecules (2 artykuły). Sumaryczny Impact Factor prac stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora wynosi 14,881, a suma punktów według punktacji MNiSW, obliczonej według roku publikacji, wynosi 340, wg

Web of Science liczba cytowań tych prac na dzień 23 sierpnia 2023 roku wynosi 9. Są to prace zespołowe, wykonane we współpracy z innymi pracownikami Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego we Poznaniu, w których doktorantka figuruje jako pierwszy z Autorów. W dokumentacji znajdują się oświadczenia współautorów potwierdzające udział w tworzeniu tych publikacji, we wszystkich procentowy udział mgr inż. Kamili Szudery-Kończal, wynosi 75%. Zgodnie z informacjami zawartymi w oświadczeniach, rola Doktorantki w przygotowaniu artykułów polegała na opracowaniu koncepcji manuskryptu, zabezpieczeniu szczepu *G. geotrichum*, hodowli mikroorganizmów, ocenie sensorycznej, ekstrakcji związków zapachowych, przeprowadzeniu analiz GC-O i GC-MS, identyfikacji i analizie ilościowej kluczowych związków zapachowych, opracowaniu wyników i ich analizie statystycznej oraz napisaniu manuskryptu.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje 43 strony maszynopisu, wraz z oświadczeniami współautorów, następnie załączone zostały publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Spis literatury zawiera 34 pozycje, wybrane spośród cytowanych w poszczególnych artykułach, w przeważającej większości oryginalne i anglojęzyczne, z których znacząca część to prace opublikowane w czasopismach międzynarodowych z tzw. listy filadelfijskiej. Większość pozycji bibliograficznych pochodzi z ostatnich 10 lat – 20 pozycji, 59%.

Praca została podzielona na 6 zasadniczych rozdziałów, obejmuje także streszczenia w języku polskim i angielskim. Forma pracy jest przejrzysta, a umieszczony na początku opracowania spis treści ułatwia czytelnikowi orientację i szybkie dotarcie do zagadnień zawartych w poszczególnych rozdziałach. Proporcje poszczególnych rozdziałów są racjonalne.

Rozdział Wstęp (zajmuje 7 stron) pełni rolę przeglądu aktualnej literatury na temat przedmiotu badań, uzasadnia również zasadność podjętych badań oraz dobór metod analitycznych. Cel badawczy, Autorka zrealizowała w 5 etapach. Sformułowała również 3 hipotezy badawcze, które Doktorantka podjęła się udowodnić lub odrzucić w toku swoich badań (treścią odpowiadają one rozdziałom w części Omówienie wyników). Metodyka badań została syntetycznie zaprezentowana na 2 stronach, a wyniki uzyskane w trakcie doświadczeń omówione zostały i krótko przedyskutowane na 10 stronach. W tekście zamieszczono również schemat zrealizowanych doświadczeń, który czytelnie prezentuje ich przebieg, a także ułatwia wyodrębnić zastosowane warianty eksperymentów. Główną część Pracy kończy 7 wniosków zestawiających najważniejsze osiągnięcia uzyskane w cyklu doświadczeń, a także krótkie podsumowanie.

Rozprawa jest zredagowana starannie, napisana poprawnym językiem, wskazuje na dobrą orientację Doktorantki w obszarze poruszanych zagadnień.

Praca rozpoczyna się Wstępem przybliżającym wątki będące przedmiotem dysertacji. Obejmuje on przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat zagadnień opisanych w pracy, m.in. naturalnych substancji aromatu i ich produkcji na drodze biotechnologicznej, ogólnej charakterystyki grzyba *Galactomyces geotrichum* wykorzystywanego w trakcie badań z uwzględnieniem procesu transformacji L-fenyloalaniny, która wykorzystywana jest przez

niego do syntezy związków aromatotwórczych, oraz krótkiego omówienia metod analitycznych wykorzystanych w podejściu sensomicznym.

Do tego rozdziału odnoszą się dwie moje uwagi dotyczące informacji zawartych na stronie 11. Pierwsza związana jest z niefortunnym sformułowaniem dwóch zdań, których treść może sugerować, że ograniczenia metod ekstrakcji związane są z czynnikami zewnętrznymi, takimi „jak warunki pogodowe, choroby roślin i szkodników, sezonowości oraz wpływu sytuacji politycznej na dostępność surowców”. Oczywiście czynniki te ograniczają dostępność źródeł wybranych komponentów aromatotwórczych, albo powodują, że dany proces ich pozyskiwania jest nieopłacalny. Natomiast sam proces ekstrakcji i jej efektywność zależy przede wszystkim od rodzaju rozpuszczalnika, czynników zewnętrznych (takich jak temperatura) i technik postępowania (np. stopień rozwinięcia powierzchni wymiany masy, intensywność mieszania faz). Nie do końca zgodzę się również ze stwierdzeniem, że „synteza *de novo* obejmuje powstawanie złożonych związków aromatycznych z prostych cząsteczek budulcowych...”, ponieważ bardzo często związki te tworzone są z cukrów prostych i innych komponentów węglowych znajdujących się w medium hodowlanym, a wykorzystywanych przez mikroorganizmy w procesach metabolicznych związanych z pozyskiwaniem energii.

Celem pracy było opracowanie parametrów procesu fermentacji do otrzymywania kompozycji aromatycznych z maślanki oraz serwatki słodkiej i kwaśnej przy wykorzystaniu pleśni *G. geotrichum* wraz z pełną charakterystyką profilu zapachowego oraz identyfikacją związków aktywnych zapachowo.

Rozdział „Metodyka badań” zawiera skrócony opis przeprowadzonych doświadczeń i wykorzystanych metod analitycznych. Opisy zamieszczone w Pracy, a także publikacjach na nią się składających są przejrzyste i świadczą o znakomitym przygotowaniu analitycznym Doktorantki do prowadzenia tego typu badań. Do realizacji doświadczeń Doktorantka wykorzystwała szeroki wachlarz metod analitycznych, do których Autorka musiała wykorzystać swoją wiedzę z zakresu zarówno mikrobiologii, jak i chemii. Zabiegi mikrobiologiczne obejmowały zabezpieczanie kultury hodowlanej oraz przygotowanie inokulatów do badań, a także określanie liczebności grzybów *G. geotrichum* oraz bakterii fermentacji mlekowej metodą posiewową. Z tą tematyką związane jest moje pytanie, ponieważ nie udało mi się znaleźć tej informacji ani w dysertacji, ani w załączonych publikacjach. Na jakim podłożu analizowano ilościowo grzyba *Galactomyces*. W Pracy znalazła się jedynie informacja, że było to podłoże z chloramfenikolem. Analizy chemiczne obejmowały ekstrakcję związków aktywnych zapachowo (z zastosowaniem metody HS-SPME i SAFE), identyfikację tych komponentów metodą GC-O i GC-MS, oznaczenie ich ilościowe metodą SIDA, a także określenie zawartości kwasu mlekowego (HPLC z detektorem RI) i wolnych aminokwasów poprzez ekstrakcję i derywatyzację przy użyciu zestawu EZ:Faast™.

Rozdział 5 prezentuje omówienie wyników uzyskanych w trakcie badań, opublikowanych w trzech artykułach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W pierwszej z nich – „The Use of Sour and Sweet Whey in Producing Compositions with Pleasant Aromas Using the Mold *Galactomyces geotrichum*: Identification of Key Odorants” opublikowanej w *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68 (39), 10799-10807, przeprowadzono skrining wśród 39

szczepów *G. geotrichum*, wyizolowanych we wcześniejszych badaniach, z wielkopolskiego sera smażonego, ze względu na ich zdolność do tworzenia aldehydu fenylooctowego i 2-fenyloetanolu (w odpowiedniej proporcji) oraz intensywność produkowanego aromatu miodowo-różanego. Pozwoliło to na wyselekcjonowanie kultury 32, która następnie użyta została do optymalizacji warunków hodowli (i rodzaju źródła węgla) na podłożu z dodatkiem serwatki kwaśnej i słodkiej. Finalnie optymalne warunki tzn. temperatura 30°C i pH 5.0, oraz dodatek sacharozy, wykorzystane zostały w hodowli bioreaktorowej. Wszystkie uzyskane próby analizowano sensorycznie, a aktywne komponenty aromatu określone były z wykorzystaniem metod GC-O i GC-MS. Zgodnie z zamierzeniem najwyższym OAV odznaczał się aldehyd fenyloetylowy, a oprócz niego stwierdzono obecność 9 innych aktywnych komponentów aromatu.

W dwóch pierwszych publikacjach badano wpływ serwatki (słodkiej i kwaśnej), na syntezę komponentów o aromacie miodowo-różanym, informacja dotycząca składu chemicznego serwatek znalazła się jedynie we Wstępie publikacji. Czy Doktorantka mogłaby omówić różnice w składzie stosowanej serwatki słodkiej i kwaśnej, ponieważ metoda ich pozyskiwania jest odmienna. Czy serwatka kwaśna uzyskiwana była metodą biologiczną czy chemiczną? Czy w momencie zestawiania podłoży hodowlanych, uwzględniano skład chemiczny serwatki, to jest obecność i poziom wybranych cukrów (np. galaktozy i glukozy), czy też kwasu mlekowego (który stosowany był również do regulacji pH)?

Nie jest jasne jak przygotowywana była gęstwa mikroorganizmu do skringu szczepów, jakie ich ilości były używane (w publikacji znajduje się jedynie informacja, że używano 10 µl)? Odnośnie ilości wprowadzanej kultury *G. geotrichum*, dotyczy moja kolejna wątpliwość. Na jakiej podstawie wybrano dodatek $3,4 \times 10^6$ CFU na objętość pożywki hodowlanej, co daje $1,7 \times 10^4$ na ml podłoża. Jest to bardzo mała ilość inokulatu, zwykle w procesach przemysłowych wykorzystuje się 10^6 - 10^7 komórek na ml podłoża. Ma to za zadanie zabezpieczenie hodowli przed potencjalnymi zakażeniami, ale przede wszystkim zwiększenie wydajności procesu. Inokulat musi uzyskać odpowiednią liczebność komórek (10^8 - 10^9), aby ukończyć proces. Przyrost poziomu komórek z 10^4 do 10^8 - 10^9 wymaga zużycia bardzo dużej ilości źródła węgla z podłoża, stąd cały proces staje się mało opłacalny ekonomicznie (ta myśl będzie kontynuowana przy omawianiu publikacji 3).

Na rysunku 1 zaprezentowano powierzchnie pików aldehydu fenylooctowego oraz 2-fenyloetanolu, a nie ich stosunek, jak Autorka podaje w tekście dyskutując wyniki. Brakuje również wykresów z wynikami optymalizacji, poza analizą wpływu dodatku różnych węglowodanów. Czy znalazły się one w materiałach dodatkowych do publikacji?

W publikacji 1 na stronie 10805, omyłkowo podano również jednostki ilości 3-metylo-1-butanolu w cydrach jabłkowych (odnośnik 38), zamiast µg/L, powinny być mg/L.

Publikacja numer 2 – “Analysis of the Ability to Produce Pleasant Aromas on Sour Whey and Buttermilk By-Products by Mold *Galactomyces geotrichum*: Identification of Key Odorants”, kontynuuje tematykę badan publikacji 1, dodatkowo analizowany jest jeszcze wpływ dodatku maślanki na produkcję przyjemnych aromatów przez kulturę *G. geotrichum*. Ponieważ wyniki porównywane są z tymi uzyskanymi dla podłoża hodowlanego z serwatką kwaśną, odnosi się wrażenie powtórzenia niektórych rezultatów zaprezentowanych w pierwszej publikacji. I tak np. czy wyniki zaprezentowane na rysunku 1, pochodzą z ponownie wykonanych analiz, czy

są powielonymi wynikami z rysunku 2 publikacji nr 1? W tabeli 1 brakuje również dokładnego opisu, które próby były analizowane. Jak rozumiem były to „hodowle kolbkowe”, ale czy były to podłoża zoptymalizowane z dodatkiem odpowiednich cukrów (sacharozy), ponieważ zwraca na siebie bardzo niekorzystny stosunek ilości aldehydu fenylooctowego i 2-fenyloetanolu (1:100), podczas gdy we wcześniejszej publikacji wynosił on 1,7:1? Czy Doktorantka mogłaby postarać się wyjaśnić skąd wzięły się tak duże różnice pomiędzy wynikami, w poszczególnych doświadczeniach.

Najciekawsze wyniki zaprezentowano w trzeciej z jednotematycznego cyklu publikacji „ The Combined Effect of Lactic Acid Bacteria and *Galactomyces geotrichum* Fermentation on the Aroma Composition of Sour Whey”, nie tylko ze względu na badanie wpływu kultury mieszanej bakterii fermentacji mlekowej z kulturą grzybową *G. geotrichum*, na produkcję związków aromatu w podłożu z serwatką kwaśną, ale również ponieważ do eksperymentów wykorzystano dodatkowe metody badawcze, określające liczebność komórek LAB i *G. geotrichum* w trakcie fermentacji, ale również badające ilość komponentów aromatu będących przedmiotem dysertacji, czy wreszcie analizujące zmiany ilości fenyloalaniny w trakcie procesu. Wyjaśniają one niektóre z wątpliwości, które miałem czytając dwie pierwsze publikacje z cyklu. Przede wszystkim wyniki te potwierdziły moją uwagę sformułowaną przy omawianiu pierwszej publikacji, że ilość wprowadzanego inokulum była zbyt niska. Maksymalną liczebność komórek *G. geotrichum* oznaczono dopiero w 6. dobie hodowli (5. od wprowadzenia kultury grzybowej). Dość nietypowo wygląda również zużycie fenyloalaniny i synteza aldehydu fenylooctowego i 2-fenyloetanolu w czasie. Następują one dopiero, kiedy mamy do czynienia już niemal z maksymalną zawartością komórek grzyba w podłożu hodowlanym. Szlak Ehrlicha jest procesem tworzenia tzw. metabolitów pierwotnych, oznacza to, że alkohole wyższe powstają z aminokwasów na skutek wzrostu/rozmnażania się komórek i wykorzystywania grup aminowych w metabolizmie azotowym. Nie stwierdzenie tego rodzaju zależności w badaniach Doktorantki może świadczyć o tym, że w środowisku hodowlanym znajdowały się inne łatwo przyswajalne substancje azotowe, wprowadzone z ekstraktem drożdżowym i/lub serwatką (oba są bogatym źródłem FAN oraz innych komponentów azotowych). Ewentualnie, podobnie jak u innych grzybów, np. przedstawicieli rodzaju *Aspergillus*, istnieje alternatywny do szlaku Ehrlicha proces w którym wykorzystywana jest fenyloalanina, ale związany z deficytem związków węglowych w środowisku. W takim wypadku w pierwszym etapie tworzona jest fenyloetyloamina (PEA), a następnie aldehyd fenylooctowy i 2-fenyloetanol. Reasumując wprowadzając większe ilości komórek w inokulacie i stosując podłoże ubogie w substancje azotowe, można by znacząco zwiększyć wydajność tworzenia aldehydu fenylooctowego, z fenyloalaniny.

Na podstawie wyników zaprezentowanych we wszystkich 3 publikacjach wysnuto 7 wniosków zaprezentowanych w rozdziale Podsumowanie i Wnioski. W podsumowaniu zabrakło mi trochę przyszłych perspektyw przeprowadzonych badań, wraz z ich potencjalnym, aplikacyjnym zastosowaniem.

W związku z tym prosiłbym Doktorantkę o odpowiedź na dwa pytania. Czy mogłaby Pani:

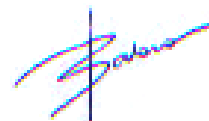
- zaproponować w jakiej postaci mogłyby zostać wykorzystane uzyskane w trakcie badań kompozycje zapachowe, do wzbogacania/modyfikacji aromatu wybranych produktów spożywczych?

- przedstawić jakie są dalsze plany Autorów dotyczące wykorzystania kultur *G. geotrichum* do biosyntezy związków aromatotwórczych?

Reasumując, Pracę przeczytałem z przyjemnością, ze względu na wieloletnie zainteresowanie zawodowe biosyntezą różnych komponentów aromatu przez mikroorganizmy. Doceniam ogrom pracy, nowatorstwo pomysłu i zastosowanych metod oraz opublikowanie wyników badań w dobrych czasopiśmie międzynarodowych. Na podstawie dysertacji wyrażam pogląd, że Doktorantka jest osobą przygotowaną do prowadzenia badań, dysponuje wieloaspektową wiedzą w obszarze przedstawionego zagadnienia oraz umie w jasny sposób prezentować wyniki swoich obserwacji i formułować wnioski. Ponadto Autorka wykazała się umiejętnością analitycznego podejścia w odniesieniu do prac innych autorów.

Podsumowując swoją ocenę stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Kamili Szudera-Kończal pt. „Wykorzystanie pleśni *Galactomyces geotrichum* do otrzymywania kompozycji aromatycznych z maślanki i serwatki. Charakterystyka związków aktywnych zapachowo w oparciu o podejście sensomiczne”, łączy aspekty naukowe z praktycznymi stanowiąc istotny wkład w dziedzinę nauk o żywności i żywieniu. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi zawarte w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz w przepisach zmieniających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca 2018 roku (Dz.U. z 2018 pozycja 1669), stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora.

Z powyższych powodów zwracam się do Dziekana oraz członków Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie pani mgr inż. Kamili Szudera-Kończal do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Paweł Satora