



Politechnika Łódźka

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Łódź, dn. 24-07-2023r.

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Klewicka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódźka

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Molskiej
zatytułowanej „Wartość odżywcza i właściwości prozdrowotne żywności
niskoprzetworzonej w postaci skielkowanych nasion gryki *Fagopyrum esculentum*
Moench w obecności drożdży probiotycznych *Scaccharomyces cerevisiae* var.
boulardii”,
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Julity Reguły
na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego
w Poznaniu.

Dane o Kandydatce

Pani mgr Marta Molska studia drugiego stopnia ukończyła w 2017 roku na kierunku Dietetyka prowadzonym przez Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; broniąc pracę zatytułowaną „Produkty mleczarskie zawierające probiotyki w profilaktyce i leczeniu wybranych jednostek chorobowych”, którą realizowała pod opieką naukową prof. dr hab. Jana Pikul. Od roku 2022 do chwili obecnej Kandydatka pracuje na stanowisku asystenta w zakładzie Dietetyki w Zamiejscowym Wydziale Kultury Fizycznej w Gorzowie Wielkopolskim, Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Z przekazanych dokumentów wynika, że Kandydatka wcześniej nie ubiegała się o stopień doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia ani w innej dyscyplinie.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z cyklu 5 publikacji o zasięgu międzynarodowym. Łączny współczynnik oddziaływania czasopism *Impact Factor*, w których zostały opublikowane prace wynosi 20,034; a suma punktów wg wykazu czasopism MNiSW wynosi 490. Wszystkie publikacje są wieloautorskie, niemniej Pani mgr Marta Molska we wszystkich publikacjach jest pierwszym autorem. Autorem korespondencyjnym jest w jednej publikacji. Z oświadczeń współautorów wynika, że p. Marta Molska była współautorką koncepcji badań, brała aktywny udział w doborze metod badawczych, przygotowaniu materiału badawczego, prowadziła opisywane w publikacjach badania, zbierała dane eksperymentalne, opracowywała je oraz przygotowywała manuskrypt do publikacji. Takie zaangażowanie wykazuje duży a nawet można stwierdzić wiodący wkład w prowadzenie badań składających się na przedstawioną dysertację doktorską.

Publikacje wchodzące w skład przedstawionego osiągnięcia zostały opatrzone dodatkowym opisem tzw. komentarzem składającym się z: wprowadzenia, celu badań i hipotez badawczych, zakresu badań, przedmiotu badań i metodyki badawczej, omówienia najważniejszych wyników, wniosków, spisu rycin i tabel, oświadczeń współautorów, i dorobku naukowego. **Taki układ pracy jest typowy dla prezentacji cyklu publikacji i spełnia wymagania ustawowe dotyczące prezentacji osiągnięcia w przewodzie doktorskim.**

Dobór i znaczenie tematyki

Obecnie wzrasta świadomość odżywiania wśród konsumentów ale jednocześnie od producentów żywności oczekuje się ciekawego pod względem smaku ale również właściwości odżywczych produktu. Kiełki dzięki swojej wartości odżywczej, łatwemu przygotowaniu nawet w warunkach domowych królują na naszych stołach nieprzerwanie od ponad 10 lat. Drugim elementem wpisującym się już na stałe do naszych przyzwyczajzeń żywieniowych jest wprowadzenie do diety probiotyków. Natomiast połączenie probiotyków oraz kiełkujących nasion daje płaszczyznę do konstruowania nowych produktów o lepszych cechach żywieniowych i potencjale prozdrowotnym. W przedstawionej do oceny pracy jako obiekt badawczy wybrano nasiona gryki zwyczajnej oraz probiotyczny szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Tematyka dysertacji jest jak najbardziej aktualna i wpisuje się w nurt badań prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Ponadto wnosi**

do wiedzy z zakresu tej dyscypliny nowe informacje dotyczące przedmiotu badań ale również proponuje rozwiązanie aplikacyjne dla przedsiębiorców sektora spożywczego.

Ocena merytoryczna pracy

Obecnie gryka uprawiana jest w Europie, Azji, Afryce Południowej, Kanadzie, Stanach Zjednoczonych Ameryki oraz Brazylii. Z danych za rok 2020 wynika, że największym producentem gryki w Europie jest Francja – 3,7 t/ha. Polska w tym samym czasie wyprodukowała 1,25 t/ha co stawia nasz kraj w wiodącej czołówce.

Wartość odżywcza gryki oraz fakt że jej ziarna nie zawierają glutenu dają możliwość do szerokiego zastosowania w produktach żywnościowych dedykowanych dla osób z nietolerancją glutenu, ale nie tylko. Gryka dotychczas najczęściej spożywana była w formie kaszy. Natomiast dynamiczny rozwój innowacji w sektorze spożywczym spowodował zastosowanie gryki w produktach piekarniczych i nie piekarniczych, w ziołolecznictwie, produktach farmaceutycznych oraz jako dodatek do pasz.

Proces kiełkowania nasion jest procesem podnoszącym wartość odżywczą poprzez zwiększenie biodostępności niektórych składników pokarmowych takich jak witaminy czy składniki mineralne. Wiadomo, że krytyczną fazą w procesie kiełkowania jest faza 2, w której następuje reaktywacja metabolizmu. Etap ten można wzmocnić poprzez dodatek do nasion mikroorganizmów endofitycznych co zwiększa wzrost plonu kiełków. Alternatywą dla mikroorganizmów endofitycznych ze względu na bezpieczeństwo stosowania w żywności mogą być probiotyki dedykowane dla ludzi głównie bakterie kwasu mlekowego ale i drożdże.

Przystępując do badań Kandydata stawia 3 cele szczegółowe, które realizuje poprzez weryfikację 5 hipotez badawczych:

1. „Kiełki gryki pozyskane w obecności drożdży probiotycznych różnią się istotnie zawartością oraz profilem składu podstawowego surowca, w porównaniu z kiełkami kontrolnymi
2. Biodostępność białek i skrobi ulega zmianie w kiełkach zmodyfikowanych w porównaniu z kiełkami kontrolnymi
3. Zmodyfikowane kiełki gryki różnią się istotnie zawartością i/lub profilem związków bioaktywnych surowca (związków fenolowych, flawonoidów), w porównaniu z kiełkami kontrolnymi

4. Modyfikacja środowiska wzrostu kiełków gryki poprzez zastosowanie dodatku drożdży probiotycznych wpływa na ich aktywność przeciwutleniającą i przeciwzapalną
5. Dodatek zmodyfikowanych kiełków gryki do diety aterogennej szczurów wpływa na parametry żywieniowe i biochemiczne krwi.”

Tak skonstruowane hipotezy badawcze i ich weryfikacja prowadzą do przeprowadzenia kompleksowych badań, które zostały ujęte w etapie badań *in vitro* i kolejnym etapie *in vivo*.

W pierwszym etapie otrzymano zmodyfikowane kiełki gryki (kiełki gryki poddane działaniu probiotycznego szczepu *S. cerevisiae* var. *bulardi*) oraz oceniono zawartość tłuszczu, procentową zawartość kwasów tłuszczowych jak i jakość mikrobiologiczną kiełków. W oparciu o uzyskane dane obliczono również wskaźnik aterogenności i trombogenności. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono około 2-krotnie wyższe w stężenie tłuszczu całkowitego kiełków poddanych kiełkowaniu zarówno w obecności probiotycznych drożdży jak i w kiełkach kontrolnych. Ponadto stwierdzono, że proces kiełkowania (bez względu na warunki) powoduje obniżenie stężenia nasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z ziarnem. Natomiast w przypadku kwasów nienasyconych nastąpił wzrost stężenia w ziarnie kiełkującym bez względu na warunki. Współczynnik aterogenności w wyniku kiełkowania ziarna obniżył się o 22% natomiast dla współczynnika trombogenności odnotowano obniżenie o 27%. W przypadku analizy mikrobiologicznej tylko kiełków gryki zwyczajnej po 3 dniach procesu kiełkowania stwierdzono w przypadku kiełków nie fortyfikowanych liczebność drożdży na poziomie 1,43 jednostek logarytmicznych, natomiast w przypadku kiełków moczonych w zawiesinie drożdży stwierdzono ich liczebność na poziomie 4,53 jednostek logarytmicznych. Brakuje ewidentnie analizy liczebności drożdży bezpośrednio po moczeniu w zawiesinie drożdży aby móc stwierdzić czy nastąpił przyrost, czy może jest to liczba bazowa, która została wprowadzona do układu kiełkowania. Ponadto pomimo początkowej dezynfekcji ziarna gryki niepokojąco wysoka jest liczba bakterii mezofilowych? Analiza mikrobiologiczna ziarna po dezynfekcji pokazałaby poziom zanieczyszczenia kiełków i ryzyko przeniesienia do układu mikroflory niepożądanego często patogennej takiej jak *Listeria* spp. czy *S. aureus*, które jak wiadomo cechują się podwyższoną opornością na niskie pH środowiska.

W kolejnym etapie określono stężenie białka i skrobi oraz ich biodostępność. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, iż kiełki zmodyfikowane charakteryzowały się najwyższą ilością białka – 144 mg/g s.m. natomiast kiełki kontrolne czyli proces kiełkowania odbywał się bez udziału drożdży cechowały się zawartością białka na poziomie 116 mg/g s.m. co było porównywalne z nasionami. Zatem można stwierdzić, że proces kiełkowania ziarna gryki w obecności drożdży *S.cerevisiae* var. *bulardii* sprzyja podwyższeniu stężenia białka w kiełkach. Natomiast niekoniecznie wiązało się to z wyższą strawnością białek. W kolejnych eksperymentach porównano ilość i biodostępność skrobi w kiełkach jak i w ziarnie gryki jako materiale wyjściowym. Stwierdzono, że podczas kiełkowania ilość dostępnej skrobi w kiełkach ulegała zmniejszeniu w porównaniu z ziarnem. W przypadku dostępności skrobi stwierdzono, że najmniejszą jej strawność zaobserwowano w kiełkach zmodyfikowanych.

Kolejnym etapem badań *in vitro* były badania dotyczące stężenia związków bioaktywnych, aktywności przeciwutleniającej oraz przeciwzapalną kiełków gryki zarówno zmodyfikowanych jak i kontrolnych oraz ziarna gryki. Oceniono również zawartość błonnika pokarmowego oraz jego frakcje. Stwierdzono, że proces kiełkowania podwyższa zawartość poszczególnych kwasów fenolowych oraz aktywności antyoksydacyjnej. Przeprowadzona analiza PCA wykazała dodatnią korelację między całkowitą zawartością fenoli a całkowitą zawartością flawonoidów przed i po trawieniu, z indeksami antyoksydacyjnymi. Ponadto stwierdzono również korelację pomiędzy działaniem przeciwzapalnym (hamowanie aktywności cyklooksygenaz) i błonnikiem pokarmowym.

Badania *in vivo* na zwierzętach laboratoryjnych, w tym przypadku były to szczury rasy Wistar (samce) przeprowadzono zgodnie ze zgodą lokalnej komisji etycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu nr. 28/2017.

Zwierzęta zostały podzielone na 4 grupy po 8 osobników, które dostawały: dietę standardową (AIN-93M), dietę standardową z dodatkiem smalcu czyli dietę wysokotłuszczową, dietę wysokotłuszczową i liofilizat kiełków kontrolnych i ostatnia grupa dietę wysokotłuszczową i liofilizat kiełków zmodyfikowanych. W przypadku porównania parametrów odżywczych nie stwierdzono wyraźnych różnic w badanych parametrach. Dieta wysokotłuszczowa sprzyjała wyższej masie zwierząt przy niższym wyjadaniu paszy natomiast dodatek liofilizatu z kiełków nie wpływał na obniżenie masy wręcz przeciwnie najwięcej ważyły zwierzęta otrzymujące dietę wysokotłuszczową z liofilizatem kiełków zmodyfikowanych. Jest to zastanawiające porównując wartość

energetyczną posiłków zjadanych przez badane grupy, która była porównywalna. Jak wyjaśnić to zjawisko? W badaniu morfologicznym parametrów krwi zwierząt doświadczalnych zasadniczo nie znajdujemy istotnych zmian, bądź zmiany są bardzo nieznaczne porównując wyniki analiz z grup diety wysokotłuszczowej stosowanej bez suplementacji liofilizatami kiełków gryki zwykłych i modyfikowanych z dietą podstawową. W ocenie recenzenta użycie stwierdzenia w rozdziale *Conclusion* w publikacji 4 (Plant Foods for Human Nutrition), że „In addition, diet with **lyophilized probiotic-rich sprouts** influenced the values of morphological parameters” jest mało zasadne. Zarówno w publikacji 4 jak i 5 nie pokazano analizy mikrobiologicznej kiełków zmodyfikowanych przed i po liofilizacji. Zatem nie wiemy czy liofilizat kiełków gryki w rzeczywistości zawierał żywe drożdże *S.cerevisiae* var. *bulardii*. Jaka była liczebność tych drożdży jeśli zawierał żywe komórki? Jeśli były żywe drożdże to czy były dostarczone w wystarczającej liczebności zgodnej z zaleceniami FAO/WHO dla żywności wzbogacanej probiotykami. Chciałbym te kwestie przedyskutować z Kandydatką podczas obrony doktorskiej. Uwagi w kwestii żywotności drożdży probiotycznych w liofilizacie kiełków gryki dotyczą również publikacji 5 (Molecules) o ile odnotowano istotne statystycznie różnice w ilości makroskładników z dodatkiem liofilizatu zmodyfikowanych kiełków gryki w odniesieniu do kiełków kontrolnych to trudno tutaj stwierdzić czy to było rzeczywiście prozdrowotne działanie drożdży probiotycznych. Zgadzam się, że żywe drożdże mogą mieć wpływ na procesy metaboliczne, w szczególności na poziomie metabolizmu jelitowego zwierząt. Oczywiście mamy grupę kontrolną – czyli dodatek kiełków bez drożdży. Natomiast nadal nie wiemy jak była liczebność drożdży. Wiadomo, że dawka dzienna probiotycznych bakterii powinna wynosić 10^9 jtk/g preparatu, natomiast w odniesieniu do drożdży probiotycznych dzienna dawka powinna wynosić 10^9 jtk/250-500 mg preparatu. Badania biodostępności składników odżywczych i prozdrowotnych obejmowały również ocenę zawartości steroli/fitosteroli, kwasów tłuszczowych w materiale pozyskanym od szczurów (krew, wątroba, kał) ale również w dietach, nasionach i kiełkach. Najwyższą z zawartością tłuszczu charakteryzowała się dieta wysokotłuszczowa, następnie dieta wysokotłuszczowa z dodatkiem kiełków kontrolnych, potem dieta wysokotłuszczowa z dodatkiem kiełków zmodyfikowanych i najmniej tłuszczu oznaczono w diecie standardowej. W przypadku wątroby zwierząt doświadczalnych to najmniej tłuszczu stwierdzono w organach zwierząt karmionych dietą standardową, potem w grupie zwierząt spożywających paszę z liofilizatem kiełków zmodyfikowanych.

W przypadku analizy steroli/fitosteroli stwierdzono podwyższenie ich stężenia w porównaniu z dietą wysokotłuszczową, poprzez dodatek do tej diety zmodyfikowanych kielków gryki. Zaobserwowano, że grupa, w której dodawano zmodyfikowane kielki do diety, miała zarówno mniejszą ilość cholesterolu w wątrobie, jak i kale w porównaniu ze szczurami karmionymi pokarmem wysokotłuszczowym.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki weryfikują pozytywnie postawione na początku pracy hipotezy. Ponadto wyniki są ciekawe, wnoszą nowe informacje do dyscypliny technologia żywności i żywienia. Badania przeprowadzono w bardzo dobrze zaplanowanym trybie, najpierw projektując nowy produkt jakim są kielki z gryki z dodatkiem drożdży o cechach probiotycznych, potem dokonując ich charakterystyki chemicznej i odżywczej wieńcząc badania eksperymentami żywieniowymi na zwierzętach. Badania przeprowadzone zostały z najwyższą starannością, przy użyciu różnorodnych technik analizy chemicznej, mikrobiologicznej i biologicznej co świadczy o bardzo dobrym warsztacie Kandydatki. Wyniki zostały opracowane i przedstawione w bardzo przejrzystej formie. Dobór literatury w opublikowanych pracach jest właściwy i zasadny.

Wniosek końcowy

Przedstawiony cykl 5 publikacji opatrzony wspólnym tytułem **”Wartość odżywcza i właściwości prozdrowotne żywności niskoprzetworzonej w postaci skielkowanych nasion gryki *Fagopyrum esculentum* Moench w obecności drożdży probiotycznych *Scaccharomyces cerevisiae* var. *boulardi*”** spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668). Założone cele badawcze zostały zrealizowane, a postawione hipotezy pozytywnie zweryfikowane. Przedstawione w pracy wyniki wpisują się nurt zagadnień badawczych prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

W oparciu o powyższe przesłanki wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o **przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Molskiej i dopuszczenie Jej do dalszych etapów postępowania.**



Wniosek o wyróżnienie

Zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Wartość odżywcza i właściwości prozdrowotne żywności niskoprzetworzonej w postaci skielkowanych nasion gryki *Fagopyrum esculentum* Moench w obecności drożdży probiotycznych *Scaccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*” złożonej w przewodzie doktorskim przez mgr Martę Molską.

Powyższa praca jest opracowaniem przedstawionym w 5 publikacjach o zasięgu światowym. Na podkreślenie zasługuje fakt umiejętności prowadzenia badań i równoczesnego ich publikowania w krótkim czasie przeznaczonym na projekt doktorski, co świadczy o sprawności naukowej, o swobodnym poruszaniu się w danej tematyce oraz ogromnej dyscyplinie samej Doktorantki. Recenzowana praca jest opracowaniem kompleksowym i wielowątkowym wymagającym od Doktorantki wiedzy i umiejętności poruszania się po analityce chemicznej, mikrobiologii i fizjologii oraz biologii zwierząt. Z przekonaniem mogę stwierdzić, że praca istotnie przekracza średni poziom prac doktorskich. Ponadto efektem końcowym jest opracowanie nowego produktu żywnościowego – kiełków gryki wzbogaconych w drożdże o cechach probiotycznych – który ma charakterystykę odżywczą i bezpieczeństwa stosowania *in vivo* oraz charakterystykę korzyści zdrowotnych. Biorąc pod uwagę fakt niezbędnej w obecnym świecie współpracy sektora nauki z przemysłem niniejszy doktorat jest ofertą technologiczną dla sektora przemysłu spożywczego i dietetycznego co zasługuje na wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku

