

Łódź, dn. 26.01.2023 r.

Dr hab. inż. Aneta Białkowska, prof. uczelni  
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka  
ul. Stefanowskiego 2/22, 90-537 Łódź  
[aneta.bialkowska@p.lodz.pl](mailto:aneta.bialkowska@p.lodz.pl)

## **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil pt. „Wdrożenie nowej linii produktów prozdrowotnych zawierających kwas alfa-ketoglutarowy”, wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem promotora prof. UPP dr hab. Darii Szymanowskiej - Powałowskiej**

### **Podstawa formalna**

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 24 listopada 2022 roku.

### **Wybór i znaczenie tematu**

Podjęta w pracy doktorskiej mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil problematyka badawcza dotycząca opracowania nowej linii produktów prozdrowotnych zawierających kwas  $\alpha$ -ketoglutarowy jest niezwykle interesująca, a jej wdrożenie ma istotne znaczenie praktyczne. Poszerza bowiem gamę produktów prozdrowotnych dedykowanych konkretnej grupie odbiorców.

Badania Doktorantki wpisują się w światowe trendy od wielu lat skupiające uwagę na roli probiotyków w utrzymaniu zdrowia konsumentów. Te cenne mikroorganizmy wpływają na zachowanie odpowiedniego stanu mikroflory przewodu pokarmowego, która jeśli zostanie zachwiana, np. poprzez nieprawidłowe żywienie, leczenie lub stres może prowadzić do zmniejszenia odporności i wywołania wielu chorób. Obecnie najbardziej popularne produkty wzbogacone bakteriami probiotycznymi to głównie produkty pochodzenia mlecznego. Cieszą się one jednak coraz mniejszą popularnością wśród konsumentów, ponieważ zawierają m.in. substancje alergenne oraz laktozę i cholesterol. Obserwując ten trend należy w pełni docenić wybór tematu badawczego przez Doktorantkę i podkreślić jego trafność w świetle zmian nawyków żywieniowych społeczeństwa. Pani Maciejewska-Gil opracowała bowiem nową technologię opartą o włączenie probiotyków w produkty pochodzenia roślinnego. Dzięki enzymom bakterii fermentacji mlekowej, m.in. amylazom, proteazom i lipazom zawarte w surowcach roślinnych polisacharydy, białka i lipidy przekształcane są do nietoksycznych

substancji smakowych, zapachowych, ale także tych modyfikujących teksturę i wpływających na właściwości atrakcyjne dla konsumentów. Doktorantka poszła krok dalej w swoich badaniach i wzbogaciła fermentowane produkty roślinne kwasem  $\alpha$ -ketoglutarynowym o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych.

W związku z przedstawionymi faktami uważam, że opracowane przez Doktorantkę produkty prozdrowotne są interesujące pod względem poznawczym, ale także aplikacyjnym. Wnoszą elementy nowości, a na szczególną uwagę zasługuje ich wielowymiarowość oparta o obecność kilku cennych dla konsumenta składników, tj. bakterii probiotycznych oraz ich metabolitów, ekstraktów roślinnych o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych, kompleksów mineralno-witaminowych i kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego. Należy również wyróżnić uwzględnienie różnic i zapotrzebowań w diecie pięciu, wytypowanych przez Doktorantkę, grup odbiorców: osób po przebytej antybiotykoterapii, osób po przebytej chemioterapii, dzieci z zespołem GAPS (zespół psychologiczno-jelitowy), przyszłych mam oraz sportowców.

### **Ocena pracy pod względem wymagań formalnych**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Maciejewskiej - Gil ma klasyczną dla tego rodzaju dokumentów strukturę i liczy 217 stron. Składa się z sześciu głównych rozdziałów (wstęp, cel pracy, część literaturowa, materiały i metody, wyniki i dyskusja, wnioski), wzbogaconych streszczeniem w języku polskim i angielskim. Istotnym elementem pracy jest bibliografia, zawierająca 306 pozycji literaturowych, uporządkowana alfabetycznie, umieszczone na 28 stronach tekstu. W pracy znajduje się ponadto 86 rysunków i 58 tabel. W mojej opinii, znacznym ułatwieniem dla czytelnika, byłoby zamieszczenie przez Doktorantkę na końcu pracy spisu rysunków i tabel. Jest to często praktykowane, zwłaszcza przy tak obszernych rozprawach doktorskich. Istotnym elementem podsumowującym badania są zamieszczone przez Panią Maciejewską – Gil instrukcje technologiczne otrzymywania płynnych produktów probiotycznych dedykowanych konkretnej grupie odbiorców. To tylko potwierdza, że opracowana technologia jest dojrzała do wdrożenia w skali przemysłowej.

Od strony edytorskiej praca jest dobrze przygotowana. Pojawiają się jedynie nieliczne błędy literowe, ale one nie zakłócają odbioru pracy i nie wpływają na wartość naukową i aplikacyjną rozprawy.

Stwierdzam, że praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim.

### **Ocena pracy pod względem wymagań merytorycznych**

Tytuł pracy koresponduje z wyznaczonym celem i treścią niniejszej rozprawy doktorskiej.

Wstęp stanowi dobre wprowadzenie w zakres planowanych badań, nakreślając w zarysie genezę pracy oraz zakres dokonanego przeglądu literatury.

Cel pracy został jasno sformułowany, choć w mojej opinii, wymagałby większego uszczegółowienia. Niemniej jednak zadania postawione przed Doktorantką były ambitne, odpowiednie dla doktoratu wdrożeniowego. Pewien niedosyt budzi, moim zdaniem, brak sformułowanych w oparciu o literaturę hipotez badawczych, które byłyby dobrym wstępem do wyników badań własnych i pozwoliłyby Doktorantce na wykazanie w tym obszarze Jej dojrzałości naukowej, a czytelnikowi umożliwiłyby uzyskanie pełnego obrazu szeroko zakrojonych badań. Hipotezy badawcze pojawiły się tylko w kontekście analizy statystycznej wybranych badań.

Część literaturowa obejmująca 42 strony opracowana została w sposób obszerny i dojrzały w oparciu o ważne i aktualne publikacje. Zdefiniowano pojęcie żywności funkcjonalnej i suplementów diety w świetle prawa. Opisano właściwości prozdrowotne wybranych surowców roślinnych, a także dokonano dogłębnej charakterystyki bakterii probiotycznych z uwzględnieniem ich cech fizjologicznych, technologicznych oraz aspektów bezpiecznego stosowania. Przedstawiono źródła i właściwości fizykochemiczne kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego oraz opisano jego wielokierunkowe działanie na funkcjonowanie organizmu. Zaprezentowano metody otrzymywania tego ketokwasu, dokonano ich porównania pod względem kosztochłonności, ale także wyszczególniono wady i zalety poszczególnych syntez: chemicznej, enzymatycznej i mikrobiologicznej.

W kilku miejscach w tej części rozprawy znajdują się drobne pomyłki i niejasne sformułowania, np.

1. na str. 19 Autorka podaje, że koenzymy to metabolity łączące się z enzymami. To dyskusyjne sformułowanie, należy bowiem pamiętać, że pod pojęciem koenzymu we współczesnej biochemii kryją się raczej kosubstraty, które nie łączą się z apoenzymem i nie stanowią jego integralnej części. Na trwałe połączone są jedynie grupy prostetyczne;
2. na str. 40 Autorka pisze, że kwas  $\alpha$ -ketoglutazarowy w cyklu Krebsa jest przekształcany do bursztynylo-CoA przez dehydrogenazę kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego, nie zgadzam się z takim zapisem, takie przekształcenie katalizuje bowiem kompleks dehydrogenazy kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego, zbudowany z kilku enzymów;
3. na str. 41 wskazana jest reakcja transaminacji AKG z udziałem dehydrogenazy glutaminianowej, taki zapis wprowadza czytelnika w błąd, reakcje transaminacji katalizowane są przez transaminazy, współpracujące z PLP;
4. na stronie 44 powinno być „grup aminowych”, a nie „amonowych”;
5. na stronie 49 zamiast używać „podwójnie dehydratowany”, powinno się raczej napisać podlegający dwukrotnej dehydratacji.

Chciałabym również poprosić Doktorantkę o doprecyzowanie co kryje się pod pojęciem „przyszłe mamy” (na etykiecie pojawia się „dla kobiet”), zapytać, czy nie ma nowszej literatury dotyczącej roli metabolicznej kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego wykazanej w badaniach na zwierzętach (Autorka wskazuje te z roku 2008). Proszę również o wyjaśnienie znaczenia terminu „proces biologiczny” wskazanego jako wada mikrobiologicznej syntezy ketokwasu.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej, należy podkreślić, że do jej przygotowania Doktorantka wykorzystała bogatą literaturę źródłową. Opracowanie to, napisane poprawnym językiem, szeroko ujmuje przedmiotową problematykę badawczą i potwierdza bardzo dobre przygotowanie do podjętego zadania. Materiał zawarty w tej części pracy, w mojej opinii, można wykorzystać do napisania artykułu przeglądowego.

Rozdział 4 pracy pt. „Materiały i metody” zawiera szczegółowe informacje na temat licznych, stosowanych przez Doktorantkę metod badawczych i analitycznych, a poprzedzony jest zestawieniem stosowanych surowców roślinnych, składem jakościowo-ilościowym mieszanek roślinnych dedykowanych konkretnym odbiorcom oraz listą wykorzystywanych bakterii fermentacji mlekowej i opisem podłoży mikrobiologicznych stosowanych do ich hodowli. Autorka wskazała także podłoża selekcyjno – produkcyjne dla producentów kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego. Z aplikacyjnego punktu widzenia ważną część tego rozdziału stanowią opisy dotyczące powiększania skali bioprocesu syntezy AKG, formułacji innowacyjnych produktów prozdrowotnych, oceny ich stabilności mikrobiologicznej oraz modelu trawienia *in vitro*. Czytając tę część rozprawy nasuwa mi się tylko jedno pytanie do Doktorantki, a mianowicie

czym kierowała się przy doborze stężeń poszczególnych surowców roślinnych podczas projektowania mieszanek, dedykowanych konkretnym grupom odbiorców.

Rezultaty przeprowadzonych badań i dyskusja wyników zostały wnikliwie omówione w kolejnym, liczącym 95 stron rozdziale zatytułowanym „Wyniki i dyskusja”. Należy podkreślić, że prace badawcze zostały zaplanowane bardzo konsekwentnie i logicznie. Realizację swoich badań Doktorantka rozpoczęła od funkcjonalnej charakterystyki mieszanek surowców roślinnych, oceniając ich potencjał antyoksydacyjny, aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz zdolności fermentacyjne. Na tej podstawie w pełni właściwie wytypowała po dwa najbardziej atrakcyjne modele dla każdej ze zdefiniowanej grupy odbiorców. I tak dla osób po antybiotykoterapii były to modele 2,4; dla osób po chemioterapii – 1 i 2; dla dzieci z zespołem GAPS – 2 i 5; dla przyszłych mam – 1 i 3; a dla sportowców – 1 i 2. Za ważne i warte podkreślenia, w kontekście opracowywania technologii przewidzianej do wdrożenia, uważam zbadanie potencjału technologicznego bakterii fermentacji mlekowych (w postaci monokultur i kultur mieszanych) pod kątem produkcji kwasu mlekowego w podłożu zawierającym melasę trzcinową. W toku dalszych badań Doktorantka skupiła się na opracowaniu procedury wydajnej biosyntezy kwasu  $\alpha$ -ketoglutarowego. W pierwszej kolejności dokonała selekcji wydajnego producenta tego metabolitu i zoptymalizowała podłoże produkcyjne. Opisane w pracy kompleksowe podejście do optymalizacji procesu technologicznego kluczowych produktów oceniam pozytywnie. Ponadto, Autorka udowodniła, że powiększenie skali procesu pozwala na uzyskanie powtarzalnych wyników dotyczących stężenia AKG w płynie pochodzonym. Badania te uważam za bardzo istotne, potwierdzające solidność opracowanej technologii. Doktorantka w trakcie swoich badań zadbała również o ocenę stabilności produktu, zarówno pod względem mikrobiologicznym, jak i składu chemicznego. To pozwoliło Jej na sformułowanie wniosku dotyczącego sposobu i czasu przechowywania opracowanych produktów. Interesujące i wartościowe są wyniki dotyczące oceny biofunkcjonalności nowo opracowanych produktów z wykorzystaniem modelu trawienia *in vitro*. Potwierdzają one wpływ innowacyjnych produktów na wzrost liczebności pożądanego drobnoustrojów i obniżenie tych potencjalnie chorobotwórczych. W opinii recenzenta Pani Maciejewska-Gil trafnie nakreśliła koszt produkcji jednego opakowania produktu probiotycznego, choć jak sama przyznaje, nie było to łatwe ze względu na zmienność wielu czynników, w tym np. politycznych, czy ekonomicznych.

Podsumowując część pracy „Wyniki i dyskusja” stwierdzam, że zakres wykonywanych badań był ambitny i szeroki. Uzyskane w trakcie ich realizacji wyniki potwierdzają, że Doktorantka zrealizowała postawione na wstępie cele. Wyniki Jej badań są cenne i stanowią ważne uzupełnienie zgromadzonej dotychczas wiedzy na temat fermentacji materiałów roślinnych i ich wykorzystania w suplementacji diety. Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż Doktorantka umiejętnie skonfrontowała wyniki swoich badań z wynikami innych autorów literatury światowej z danego zakresu badawczego. To potwierdza dojrzałość naukową Pani Maciejewskiej-Gil.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz otrzymanych wyników Autorka sformułowała 7 wniosków. Świadczą one o realizacji wyznaczonego celu badań.

Rozprawa doktorska jest podstawą do dyskusji naukowej, a pytania przedstawione poniżej wynikają z czystej ciekawości recenzenta:

1. Czy w opinii Doktorantki, matematyczna optymalizacja procesu produkcji kwasu  $\alpha$ -ketoglutarowego, np. metodą Taguchi przyniosłaby większe korzyści? Jeśli tak, to proszę o uzasadnienie.

2. Czy słuszne byłoby dokonanie analizy SWOT w kontekście atrakcyjności technologii i walorów prozdrowotnych gotowego produktu?
3. Czemu pH mieszaniny imitującej płyn żołądkowy obniżono do 4,0? Optymalne pH działania pepsyny jest niższe. Proszę o uzasadnienie takiego podejścia.
4. Czy w instrukcjach technologicznych otrzymywania produktów probiotycznych nie powinno się uwzględnić etapów, w których wymagana jest kontrola jakości produktów? Czy Autorka zakłada takie analizy, jeśli nie, to proszę o uzasadnienie.

### **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Maciejewskiej – Gil pt. „Wdrożenie nowej linii produktów prozdrowotnych zawierających kwas alfa-ketoglutaryny” wykonana pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Darii Szymanowskiej - Powalowskiej spełnia wymagania stawiane przez art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.). Jest wartościowym dorobkiem naukowym, zawiera nie tylko badania poznawcze, ale przede wszystkim interesujące rozwiązanie technologiczne badanego problemu. Rozprawa doktorska stanowi wartościowe podejście do opracowania optymalnego, ekonomicznie uzasadnionego procesu produkcji produktów prozdrowotnych wzbogaconych o kwas  $\alpha$ -ketoglutaryny. W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Maciejewskiej - Gil do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Aneta Białkowska, prof. uczelni