



**WYDZIAŁ  
NAUK O ŻYWNOŚCI  
I BIOTECHNOLOGII**

Dr hab. inż. Dominik Sz wajgier, prof. UP w Lublinie

Kierownik Pracowni Żywności Ekologicznej Pochodzenia Roślinnego  
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka  
ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

Lublin, 12 stycznia 2023 r.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Autor: mgr inż. **Paulina Maciejewska-Gil**

Tytuł:

### **„WDROŻENIE NOWEJ LINII PRODUKTÓW PROZDROWOTNYCH ZAWIERAJĄCYCH KWAS ALFA-KETOGLUTAROWY”**

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz Living Food Sp. z o.o. z siedzibą w Trzcielu w ramach Programu MNiSW „Doktorat wdrożeniowy” (0019/DW/2018/02)

**Promotor:** prof. UPP dr hab. Daria Szymanowska-Powałowska

Recenzję wykonałem na podstawie Pisma Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Pani prof. dr hab. Magdaleny Rudzińskiej, informującego o Uchwale nr 1/XXIV/2022 z dnia 24 listopada 2022 r., na mocy której zostałem powołany na recenzenta niniejszej rozprawy doktorskiej.



## 1. Przedstawienie podstawowych danych o kandydacie

Pani Paulina Maciejewska-Gil uzyskała tytuł magistra 8.06.2017 r. na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii UP w Poznaniu. Tytuł pracy magisterskiej, wykonanej pod kierunkiem dr inż. Joanny Le Thanh-Blicharz, w Zakładzie Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego w Poznaniu: „Możliwość wykorzystania skrobi opornych na amylolizę do tworzenia emulsji spożywczych”.

Pani Paulina Maciejewska-Gil odbyła kilka praktyk zawodowych: przez miesiąc, w lipcu 2015 r. w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Waclawa Dąbrowskiego w Poznaniu, od 07.2015 – 03.2016 w Laboratorium Analiz Medycznych w Poznaniu; w sierpniu 2016 r. w Laboratorium Rozlewu, Kompanii Piwowarskiej w Poznaniu. Następnie była laborantem w Polbiotech Laboratorium Sp. z o.o. w Poznaniu (01.2017 – 09.2017), w Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu (02.2018 – 09.2018) i w laboratorium mikrobiologicznym w Living Food Sp. z o.o. w Trzcielu (od 10.2018 r.).

Jak wynika z oświadczenia Pani Pauliny Maciejewskiej-Gil, nie ubiegała się uprzednio o nadanie Jej stopnia doktora.

## 2. Dobór i znaczenie tematu

Naukowcy oraz przedsiębiorcy coraz bardziej interesują się projektowaniem i wytwarzaniem żywności funkcjonalnej, wzbogaconej naturalnymi surowcami wnoszącymi do produktu cenne składniki bioaktywne. Wychodzą oni naprzeciw rosnącej świadomości oraz potrzebom różnych grup konsumentów. W przypadku niniejszej rozprawy, Autorka wybrała grupy docelowe konsumentów: po przebytej antybiotykoterapii, chemioterapii, dzieci z zespołem GAPS, sportowców oraz przyszłe matki. Dobór grup odbiorców jest z przez Autorkę z pewnością przemyślany a wybór każdej grupy jest uzasadniony. Oczywiście podobnych grup odbiorców produktów funkcjonalnych jest więcej, ale rozprawa doktorska musi się mieścić w pewnych ramach objętości. Potrzeby każdej z grup są w pewnym stopniu realizowane- na rynku mamy przecież suplementy diety zawierające jeden lub większą liczbę składników bioaktywnych. W tej tematyce mieści się przedstawiona do oceny praca Pani mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil. Jednak, w odróżnieniu od obecnej oferty rynkowej, zaprezentowana praca w sposób o wiele bardziej kompleksowy projektuje, komponuje a następnie testuje bardzo złożone produkty funkcjonalne, co jest nowością. Najważniejszym celem pracy było stworzenie produktów rynkowych o złożonym składzie, zawierających zarówno liczne komponenty roślinne, jak i żywe drobnoustroje probiotyczne oraz kwas alfa-ketoglutarowy (AKG). W rezultacie otrzymujemy propozycję wdrożenia nowo opracowanych produktów dla pięciu wyżej wymienionych grup. Znaczenie podjętych badań, w świetle mojej wiedzy jest bardzo duże ze względu na bardzo szeroki zasięg kręgu odbiorców, zwłaszcza że celem pracy jest stworzenie realnych możliwości do wdrożenia receptur w warunkach przemysłowych. Dobór tematu pracy jest zatem w pełni uzasadniony.



### 3. Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska ma formę monografii liczącej 202 strony i 15 stron załączników. Ma układ rozdziałów typowy dla prac eksperymentalnych w dziedzinie nauk przyrodniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Wstęp (2 strony) w wystarczającym stopniu wprowadza w tematykę podjętą w rozprawie. Następnie, jasno sformułowany cel określa podstawowe zadanie wyznaczone do wykonania w ramach niniejszej rozprawy: opracowanie receptur, wykonanie badań nad funkcjonalnością i propozycja komercjalizacji produktów zawierających szczepy bakterii probiotycznych, surowce roślinne oraz AKG. Część literaturowa obejmuje 43 strony i w sposób logiczny i chronologicznie uporządkowany zawiera omówienie wszystkich niezbędnych aspektów naukowych i aplikacyjnych, związanych z realizacją celu postawionego w pracy. Rozdział Materiały i metody liczy 21 stron i jest zakończony schematem obrazującym plan wykonanych doświadczeń. W rozdziale Wyniki i ich dyskusja, liczącym 96 stron, każda grupa wyników została zaprezentowana i przedyskutowana. Na str. 171 znajdujemy 7 wniosków z pracy, mających charakter poznawczy i aplikacyjny. Podkreślam, że rozprawa została zrealizowana w ramach programu Doktorat wdrożeniowy którego celem jest nie tylko zrealizowanie badań zaplanowanych w indywidualnym planie badawczym ale przede wszystkim wskazanie potencjału wdrożeniowego wyników pracy, co zostało uczynione. Kolejną część pracy to spis 306 wykorzystanych pozycji literaturowych. Zdecydowana większość cytowanych prac pochodzi ze znaczących czasopism naukowych. W dalszej części monografii znajdujemy jednostronicowe streszczenia (po polsku i po angielsku) oraz 5 załączników (instrukcje technologiczne otrzymywania pięciu finalnych produktów opracowanych w ramach rozprawy doktorskiej; łącznie 15 stron). W pracy zamieszczono 58 tabel i 86 rysunków.

### 4. Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona do oceny praca jest typową pracą z zakresu technologii żywności i żywienia człowieka, a część analityczna jak i aplikacyjna zaznaczone są w równym stopniu. Autorka Przedstawiła w rozprawie kolejne etapy realizacji prac w sposób uporządkowany, logiczny i konsekwentny. Zaprezentowała warsztat badawczy który opracowała w celu realizacji zamierzonego celu oraz celów cząstkowych do niego prowadzących. Przeprowadziła eksperymenty a wyniki poprawnie zinterpretowała, co nie było łatwym zadaniem z uwagi na stopień skomplikowania zadań założonych do wykonania. Autorka jawi nam się jako osoba chętna do pozyskiwania wiedzy naukowej oraz twórczego wykorzystania tej wiedzy na potrzeby zmieniającego się rynku.

W Części literaturowej Doktorantka omawia w pierwszej kolejności prawne i funkcjonalne aspekty związane z komponowaniem żywności specjalnego przeznaczenia. Wskazuje podstawowe grupy związków wykazujących aktywności przeciwutleniające (polifenole i karotenoidy, wraz z krótką charakterystyką źródeł tych związków). Następnie Przedstawia główne składniki mineralne i witaminy wraz z ich podstawowymi funkcjami w organizmie oraz źródłami w diecie. Podrozdziały są krótkie i z pewnością nie przedstawiają pełnej wiedzy ale moim zdaniem nie było potrzeby ich nadmiernie rozbudowywać. W moim odczuciu zamierzeniem Autorki nie było epatowanie wiedzą a jedynie przedstawienie głównych aktywności jakie poszczególne składniki mają wnieść do projektowanej żywności. W dalszej części Autorka Przedstawia bardzo krótkie opisy 46



surowców roślinnych, obejmujące charakterystykę zawartych w nich związków bioaktywnych oraz podstawowych aktywności *in vivo*. Surowce roślinne i ich aktywności *in vivo* są znane dlatego też uważam że takie bardzo syntetyczne opisy przedstawione przez Autorkę są wystarczające.

**Mam jednak wątpliwości dotyczące doboru części prac zamieszczonych w tym rozdziale, a mianowicie użycie prac przeglądowych nie z ostatnich lat a starszych, nawet sprzed ponad 10 lat. Proponuję w czasie przygotowywania wyników do opublikowania cytować jak najnowsze prace, zwłaszcza jeśli to są prace przeglądowe. Znalazłem również pewną liczbę błędnych cytowań, np. cytowanie pracy Verma i in. [2015] w miejscu gdzie powinna być zacytowana praca Kaushik in., [2011], pojawiająca się dalej. Na str. 24 żadna z zacytowanych prac dotyczących granatowca właściwego nie przedstawia wyników dotyczących funkcji poznawczych („Wpływa korzystnie na funkcje poznawcze, w tym pamięć”) [Al-Zoreky 2009; Mertens-Talcott i in. 2006]). W pracy Li i in. (2018) cytowanej na str. 25 nie badano aktywności cyt: „Ponadto zapobiegają infekcjom pęcherza moczowego oraz zwyrodnieniu plamki żółtej oka”. Cytowana praca dotyczy wpływu obróbki pomocniczej przy wstępnym schładzaniu owoców jeżyny na aktywności przeciwutleniające *in vitro* oraz na aktywność niektórych enzymów z owoców. Podobnie Mosaffa-Jahromi i in. (2017, str. 20) nie określali zawartości związków bioaktywnych w anyżu a jedynie jego wpływ na przebieg zespołu jelita drażliwego. W pracy Plaza i in. (2012), str. 23, dotyczącej chlorelli, czytamy: „Posiada właściwości przeciwnowotworowe, przeciwutleniające oraz przeciwbakteryjne”- autorzy tej pracy nie wykazali właściwości przeciwnowotworowych a jedynie 2 pozostałe aktywności. Wspomniane aktywności wymienione są we wstępie tej publikacji ale sugeruję w takich przypadkach dwie inne drogi postępowania, jeśli chcemy przytoczyć takie wyniki: albo zacytować pracę oryginalną, eksperymentalną, w której te aktywności określono, po to aby oddać hołd rzeczywistym autorom wyników, albo zacytować bardzo dobrą, jak najnowszą pracę przeglądową i rozważyć sformułowania typu: „Aronia przeciwdziała chorobom sercowo-naczyniowym oraz nowotworom jelita grubego co omówiono w sposób wyczerpujący w doskonałej pracy przeglądowej ....”.**

W kolejnej części Autorka omówiła ogólnie, ale w sposób wystarczający cechy, jakimi charakteryzują się bakterie probiotyczne, przechodząc do siedmiu gatunków i szczepów bakterii mlekowych, które Przedstawiła w sposób bardziej szczegółowy, kładąc nacisk głównie na funkcje tych drobnoustrojów w organizmie człowieka.

W następnych, bardziej rozbudowanych podrozdziałach Autorka przedstawia źródła AKG oraz rolę tego związku w organizmie człowieka. Przedstawienie istotnych funkcji tego związku jest ze uzasadnione bo wyjaśnia dlaczego Autorka zamierza zastosować dodatek właśnie tego kwasu organicznego do swoich produktów. Następnie Autorka Omawia w sposób dość kompaktowy, lecz wystarczający, metody otrzymywania AKG. Dokonując wyboru metody uzyskania AKG na cele badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, Kieruje się wskazaniem literaturowym, że najefektywniejszym producentem AKG są drożdże *Yarrowia lipolytica*. Zgadzam się z taktyką przyjętą w pracy - celem pracy nie było poszukiwanie najefektywniejszego drobnoustroju produkującego AKG, lecz optymalizacja jego produkcji i zastosowanie do nowych produktów.

Cel pracy jest sformułowany w sposób jasny i nie budzi wątpliwości.



W części **Materiały i metody** (21 stron) Autorka Zamieściła źródła komponentów roślinnych (dostawców) oraz 5 Tabel (Tab. 10-14) z proponowanymi recepturami wyjściowych mieszanek roślinnych, po 5 propozycji dla każdej grupy konsumentów. Wcześniejsza analiza literaturowa Autorki daje jasną odpowiedź które rośliny lub które części roślin użyć do danej kompozycji, dla osiągnięcia zamierzonego celu, czyli stworzenia celowanego produktu.

- Czy można prosić o przedstawienie sposobu, w jaki Autorka Ustaliła kompozycje przedstawione w Tab. 10-14?. Jakim kluczem Autorka zastosowała, przyjmując właśnie takie proporcje komponentów w swoich mieszankach roślinnych, w 5 wariantach dla każdego produktu, łącznie 25 kompozycji? Czy były wykonane wstępne badania w tym zakresie?

Autorka przedstawia skład kompozycji bakterii mlekowych do zastosowania w każdym z 5 produktów. Zgadzam się z wyjaśnieniem Autorki, że te kompozycje można ustalić na podstawie analizy bogatej literatury w temacie.

Następnie Pani mgr prezentuje składy wszystkich podłoży używanych w czasie wykonywania badań i wymienia nazwy szczepów drobnoustrojów. Dobór drobnoustrojów (zarówno bakterii mlekowych jako składników produktów, innych bakterii oraz drożdży używanych do produkcji AKG) jest moim zdaniem właściwy, jak również zastosowane pożywki i podłoża selekcyjne oraz produkcyjne. Mam jednak kilka pytań:

- dlaczego do namnażania bakterii mlekowych używano jako źródła węgla melasę trzcinową (również w podp. 8.1. Metod badań)? Zapewne chodziło o przemysłową utylizację tego odpadu, jednak zastosowanie melasy jako źródła węgla jest stosunkowo mało popularne.
- na podstawie jakich prac opracowano skład podłoża selekcyjno-produkcyjnego do syntezy AKG przez bakterie (Tab. 18)?

W podp. 2. Metod otrzymujemy informację o prowadzonej ekstrakcji:

- domyślamy się że czy trzy ekstrakty wodne opisane w podpunkcie 2, uzyskane z ekstrakcji próbki, połączono i analizowano dalej jako jedną próbkę?
- oznaczanie zawartości związków fenolowych oraz zdolności do „zmiatania” wolnych rodników DPPH (p. 3 i 4) wykonano przy użyciu ekstraktów wytworzonych w podpunkcie 2. Dlaczego użytym rozpuszczalnikiem była woda? Surowce użyte do badań są bogate w związki o charakterze lipofilowym lub częściowo lipofilowym a częściowo hydrofilowym. W związku z tym, czy zastosowanie rozpuszczalników o różnych polarnościach nie przyniosłoby wyższej wydajności ekstrakcji?
- metodyki przedstawione w podpunktach 2 i 3 jak również niektóre późniejsze metodyki są opisane bardzo ogólnie, w sposób uniemożliwiający odtworzenie postępowania. W



przygotowywanych publikacjach proponuję przedstawić alternatywnie: albo tylko cytowanie wcześniejszej metody (jeśli wiernie odwzorujemy metodę) albo szczegółowo całą metodę lub te elementy, które zmodyfikowaliśmy na swoje potrzeby.

W p. 10 Metod (str. 70) dowiadujemy się jak skomponowane zostaną finalne produkty. Podobnie, kompletny schemat badań jest przedstawiony na stronie 74. Obie informacje moim zdaniem należało umieścić wcześniej.

Metody opisane w podpunkcie 5 (przygotowanie *inoculum*, oznaczenia liczebności populacji i aktywności przeciwdrobnoustrojowych) są metodami standardowymi i nie budzą wątpliwości.

W przypadku Metod przedstawionych w podpunkcie 6 (Testy fermentacyjne z wykorzystaniem opracowanych modeli mieszanek roślinnych) mam kilka pytań:

- dlaczego prowadzono fermentację w tak dużych objętościach (22 litry)?
- niektóre z mieszanek zawierały bardzo istotne dodatki takich składników jak owoce aronii czy jagody leśnej które, z uwagi na obecność związków polifenolowych i terpenowych, mogą wpływać hamująco na wzrost bakterii. W związku z tym jakie były objętości (naważki) składników, w stosunku do liczebności dodanych kultur?
- [REDAKTED] czy były jakieś testy wstępne albo przesłanki literaturowe dotyczące czasu trwania fermentacji? Głównym celem fermentacji było zbadanie wpływu kompozycji roślinnej na wzrost bakterii podczas fermentacji. Przy tak zróżnicowanych składach mieszanek i różnych szczepach, kinetyka wzrostu bakterii może być różna w poszczególnych hodowlach stąd czy pobrano i przebadano próbki z fermentora nie tylko na początku i po 14 dniach ale również w okresach pośrednich?
- czy wstępnie badano czystość mikrobiologiczną roślinnych komponentów wchodzących w skład tych mieszanek? Co prawda dostawcy mieszanek mogą zapewnić takie dane ale mieszanki przygotowywano w laboratorium na cele tych badań i wtedy mogły ulec zakażeniu wtórnemu stąd pytanie o weryfikację wstępną surowców roślinnych.

P.7.1: metoda HPLC oznaczania zawartości składników opisana jest w stopniu wystarczającym.

P. 8.1 i 8.2:

- Chciałbym zapytać jak uzyskano w butelkach Pyrex „warunki względnie tlenowe” w wytrząsarce rotacyjnej i czy badano w butelkach hodowlanych stężenie tlenu, który może mieć znaczenie dla bardziej wrażliwych drobnoustrojów takich jak *Bifidobacterium*?

P. 8.3:

- [REDAKTED]



[REDAKCYJNE] czy kontrolowano w butelkach stężenie tlenu i jeśli tak to w jaki sposób?

Opis eksperymentów mających na celu optymalizację produkcji AKG w p. 9 jest pełny i zadowalający.

W p. 10 dostajemy informację o formulacji gotowych produktów i analizach czystości mikrobiologicznej składników produktów (pod kątem obecności kilku grup drobnoustrojów patogennych) a w p. 11 opisano w jaki sposób była badana stabilność (pod kątem zmiany stężenia kwasów organicznych i etanolu oraz obecności drobnoustrojów patogennych) produktów przechowywanych przez 3 miesiące. Gotowe produkty podlegały trawieniu *in vitro* (p.12.1). Nie istnieje jedna, uniwersalna metodyka trawienia *in vitro*. Trawienia *in vitro* realizowane przez różne zespoły bardzo różnią się pod względem szczegółów zawartych w metodykach, chociaż doszło do prób ujednoczenia tych trawień, największą próbą były wieloosobowe prace Minekus i in. (2014) i ich kontynuacja Brodkorb i in. (2019). Na Rys. 9 przedstawiono elementy modelu:

- dlaczego pominięto etap trawienia w „jamie gębowej” z udziałem  $\alpha$ -amylazy (co mogło prowadzić do modyfikacji skrobi i produktów jej hydrolizy)?
- dlaczego etap „żołądka” trwał aż 4 godz. natomiast „jelita cienkiego” tylko 2 godz.?

W p. 12.2 znajdujemy plan eksperymentu polegającego na wprowadzeniu do trawienia *in vitro*, na etapie „jelita grubego”, „5 wystandaryzowanych zaszczepek mikrobiomu jelitowego”. Następnie dowiadujemy się o 5 grupach dawców tych „zaszczepek”: osoby zdrowe, >75 roku życia, osoby po antybiotykoterapii, osoby po chemioterapii i osoby z BMI > 30. Jest to moim zdaniem bardzo interesujący, nowatorski pomysł na badania, mający na celu sprawdzenie, czy nowoopracowane produkty zawierające bakterie probiotyczne będą wpływały na normalizację upośledzonego mikrobiomu poprzez obniżanie tempa wzrostu drobnoustrojów potencjalnie patogennych:

- proszę o bliższą charakterystykę „*inoculum*” (czym są „zaszczepki”, jak zostały przygotowane przed wprowadzeniem do „jelita grubego” i czy został określony ich skład);
- dostajemy informację, że po tym eksperymencie, w dostarczonym przez dawców *inoculum* analizowano zawartość 5 rodzajów bakterii jelitowych i 1 rodzaj drożdży. Czy taka charakterystyka mikrobioty jest wystarczająca, biorąc pod uwagę że w przewodzie pokarmowym człowieka może znajdować się kilka tysięcy szczepów?

W rozdziale **Wyniki i dyskusja** (96 stron) Autorka w pierwszej kolejności Zaprezentowała wyniki dotyczące wydajności ekstrakcji składników z mieszanek roślinnych które to mieszanki roślinne, po połączeniu z *inoculum* i płynem pochodowlanym zawierającym AKG, będą stanowić nowe produkty. Następnie otrzymujemy wyniki dotyczące zawartości polifenoli ogółem (tutaj zakradł się błąd bo najwyższe stężenie stwierdzono w mieszance A2 a nie A1) i aktywności przeciwutleniających ze wskazaniem ekstraktów o najwyższych wspomnianych parametrach (Rys 13 i 14). Autorka słusznie wskazała że nie można szukać prostej zależności pomiędzy



efektywnością ekstrakcji i dwoma pozostałymi parametrami i trafnie dokonała wyboru najefektywniejszych wariantów mieszanek, zależnie od grupy docelowej. Autorka potwierdziła wzrosty bakterii probiotycznych w przypadku wszystkich 25 kombinacji mieszanek roślinnych z dodatkiem melasy. Zaproponowała po 2 warianty mieszanek roślinnych dla każdej docelowej grupy konsumentów. Na tym etapie doprecyzowania składu mieszanek mam pytanie:

- czy zachowano przybliżone proporcje pomiędzy *inoculum* i dodatkiem ilości suchej masy w cieście studzienkowo-dyfuzyjnym (p. 5.4. Metod) i w czasie komponowania finalnego produktu do spożycia?

Następnie Autorka Wskazała optymalne warunki dla wzrostu pojedynczych szczepów bakterii i produkcji kwasu mlekowego przez siedem szczepów bakterii mlekowych, przy 4 poziomach dodatku melasy trzcinowej do podłoża hodowlanego (Rys. 17-44). Kolejne wyniki dotyczą wykorzystania sacharozy, glukozy i fruktozy przez 7 pojedynczych szczepów bakterii (Rys. 45-51) oraz zmiany liczby bakterii i produkcji kwasu mlekowego w czasie fermentacji prowadzonej w obecności melasy [REDACTED] przez zestaw bakterii probiotycznych w surowcach roślinnych przeznaczonych dla 5 docelowych grup konsumentów (Rys. 52-61). Wyniki zgromadzone na Rys. 17-51 mogą być przydatne do optymalizacji wzrostu badanych szczepów jak i produkcji kwasu mlekowego w podłożu zawierającym melasę. Wysoką wartość w moim odczuciu mają natomiast wyniki zgromadzone na Rys. 52-61 ponieważ dotyczą badań prowadzonych na kompozycjach co prawda jeszcze nie docelowych, ale zawierających już składniki roślinne i komplet szczepów bakterii. [REDACTED]

- na Rys. 17- 61 zastosowano wykresy ciągłe – czy prowadzony był ciągły pomiar parametrów czy też pomiary prowadzono w określonych punktach czasowych? W takim wypadku lepszym rozwiązaniem byłyby wykresy np. słupkowe; ponadto brak wartości odchyłeń standardowych przy wynikach.

W p. 2.3. Autorka przedstawia wyniki prac nad produktem w skali przemysłowej- po 2 mieszanki surowców roślinnych przypadające na każdą grupę docelową są poddane pasteryzacji [REDACTED]. Jałowe mieszanki roślinne Autorka szczepiła odpowiednio dobranymi *inocula* i prowadziła fermentację w wybranych wcześniej warunkach [REDACTED]. Autorka oznaczała liczebność bakterii mlekowych ogółem (LAB), z rodzaju *Bifidobacterium*, drożdży i pleśni (Tab. 23).

- Czy można prosić o wyjaśnienie dlaczego Autorka nie Oznaczyła liczebności bakterii *Lactobacillus*;
- ponadto, w każdej z 5 kompozycji drobnoustrojów obecne były bakterie *Streptococcus* mające wnosić pozytywne działanie do produktu ale w Tab. 23 nie otrzymujemy informacji czy te bakterie są obecne w produktach i na jakim poziomie.





Na podstawie wyników z p. 2.3., Autorka wytypowała po 1 kompozycji roślinnej, dla każdej grupy odbiorców, poddawanej fermentacji mlekowej. Przeszła następnie do produkcji AKG w celu dopełnienia kompozycji. Tabela 24 jest powtórzeniem Tab. 19 i jest zbędna. Na podstawie Rys. 63 i Tab. 25 Autorka do dalszych prac Wybrała 2 szczepy drożdży *Yarrowia lipolitica* oraz najbardziej optymalne podłoże hodowlane a warunki produkcji dalej w prawidłowy sposób optymalizowała, aż do objętości 100 dm<sup>3</sup> podłoża hodowlanego (Rozdz. 3.2., Rys. 64-81). W niniejszej pracy etapy optymalizacji produkcji AKG są bardzo rozbudowane. Na podstawie analizy literatury którą zrobiłem, dotyczącej warunków produkcji AKG stwierdzam jednak że ta bardzo rozbudowana część optymalizacyjna jest niezbędna. Prace innych autorów podają różne warunki produkcji AKG i doprecyzowanie ich było konieczne a nie da się tego zrobić w sposób uproszczony, skrócony.

W rozdz. 4 **Wyników i dyskusji** Autorka przedstawiła skład finalnych produktów. Wykazała bezpieczeństwo (pod względem mikrobiologicznym) pięciu produktów po fermentacji mieszanek roślinnych z kompozycjami bakterii mlekowych oraz po dodaniu płynu pohodowlanego zawierającego AKG (Tab. 27). Przeprowadziła testy przechowalnicze finalnych produktów wskazując brak zarodników grzybów i drożdży w produktach oraz utrzymanie się lub niewielkie obniżenie liczebności bakterii kwasu mlekowego w pięciu produktach finalnych po 1 i 3 miesiącach przechowywania w temperaturach 4 i 20 °C. **Cel pracy został osiągnięty**- po 3 miesiącach przechowywania mamy produkty zawierające satysfakcjonujące liczebności żywych bakterii kwasu mlekowego, nie mamy drożdży, pleśni i drobnoustrojów chorobotwórczych ani niechorobotwórczych uznawanych za „psujące” żywność (Tab. 28). Autorka wykonała też (nie budząc wątpliwości co do metodologii) analizę statystyczną wyników zawartości AKG (Tab. 29) i dowiodła statystycznie że zawartość AKG była stabilna w czasie 3-miesięcznego przechowywania.

Jednak mam kilka pytań i prosiłbym o wyjaśnienie:

- zarówno opis Metod w p. 10 i 11 na str. 70 jak i wyników przechowalniczych w p. 5 na str. 143 nie mówi, jak zapakowano produkty do przechowywania, jaki był skład atmosfery, czy był dostęp światła przez opakowanie itd. Charakter rozprawy zakłada wdrożenie a więc również finalny wygląd (opakowanie) produktu na półce. Stąd, jeśli mamy do czynienia z fakultatywnymi heterofermentatywnymi szczepami LAB, a takie były obecne w szczepionkach, możemy się spodziewać, poza kwasem mlekowym, również produkcji gazów;
- jeśli grupa LAB stanowiła we wszystkich 5 finalnych produktach ok. 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> jtk/cm<sup>3</sup>, to co oznacza pojęcie „ogólna liczba drobnoustrojów” OLD na poziomie 10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup> jtk/cm<sup>3</sup> przed przechowywaniem i po 3 miesiącach przechowywania?;
- zmiany chemiczne w składzie produktów finalnych (Tab. 29) będą występować, zwłaszcza że produkty zawierają żywe drobnoustroje (zmiany występowałyby przecież również w produkcie jałowym). W związku z tym czy została wykonana analiza sensoryczna produktów (zaraz po wytworzeniu i po przechowywaniu)?

Przechodząc do **Wyników** w p. 6 chciałbym stwierdzić że moim zdaniem są one jednymi z najbardziej wartościowych w pracy. Autorka wykazała w modelu trawienia *in vitro*, że w czasie pasażu występowało obniżanie liczebności bakterii (z największym obniżeniem po



pasażu przez „żołądek”) (Tab. 30-34). Niemniej jednak, obniżenie liczebności o 1-2 rzędy wielkości, przy zawartościach bakterii na poziomie  $10^6$ - $10^7$  jtk/cm<sup>3</sup> jest wynikiem zadowalającym w uwagi na rolę jaką ma pełnić szczepionka bakteryjna zawarta w produktach. Do nowoopracowanych produktów poddawanych trawieniu *in vitro* dodano na etapie „jelita grubego” *inoculum* pobrane od osób zdrowych, po antybiotyko- i chemioterapii, osób po 75 r.ż. lub osób otyłych. Biorąc pod uwagę, że Autorka zbadała w tym doświadczeniu wpływ na 4 gatunki prawidłowych drobnoustrojów, na 4 grupy potencjalnie patogennych drobnoustrojów, za każdym razem w stosunku do mikroflory pobranej od pięciu grup pacjentów, i że Zbadała pięć finalnych produktów handlowych, otrzymujemy setki wyników liczebności bakterii (Tab. 35-44). Wyniki te można podsumować stwierdzeniem, że każdy z nowoopracowanych produktów wykazał pozytywny wpływ w stosunku do przeważającej części prawidłowych drobnoustrojów przyczyniając się jednocześnie do obniżenia liczebności większości drobnoustrojów potencjalnie chorobotwórczych. Uważam że te wyniki są bardzo interesujące i niosą bardzo duży ładunek nowej wiedzy z uwagi na to że badane były produkty o nowych, oryginalnych składach.

W p. 7 **Wyników** (Rys. 82-86) Autorka prezentuje 5 projektów etykiet, po jednym dla finalnego produktu:

- czy przedstawione wzory etykiet to wynik preselekcji wykonanej wśród potencjalnych konsumentów?

Zgadzam się z Autorką, że obecnie wycena produktów jest bardzo trudna nie tylko w związku z panującą niestabilnością finansową na świecie, ale również dlatego że rynek tego typu produktów bardzo rozwija się w ostatnich latach. Stąd trudno, przy rosnącym popycie na surowce składowe sprowadzane z różnych rejonów świata, przewidzieć koszty produkcji, gdyby nawet pominąć ogólnoświatowe kryzysy.

W p. 9 **Wyników** Autorka sformułowała, w ramach analizy statystycznej, cztery hipotezy badawcze. Hipotezy, które przy użyciu prawidłowo dobranych narzędzi statystycznych, następnie potwierdziła: wpływ wartości pH, stężenia rozpuszczonego w podłożu tlenu i skali hodowli na syntezę AKG. Autorka potwierdziła również statystycznie że pod względem liczebności bakterii fermentacji mlekowej, stabilność, przez cały okres przechowywania, wykazywały produkty przeznaczone dla osób po antybiotykoterapii, chemioterapii oraz dla przyszłych mam.

Odnosząc się do sposobu prowadzenia **Dyskusji wyników** własnych z wynikami innych autorów należy stwierdzić, że Autorka prowadzi dość ograniczoną dyskusję odnosząc się do wyników badań innych autorów którzy analizowali pojedyncze surowce roślinne. Jest to dla mnie zrozumiałe i całkowicie akceptowalne ponieważ Autorka sporządziła unikatowe kompozycje i w tej sytuacji trudno jest prowadzić dyskusję wyników z innymi autorami, w sytuacji braku analogicznych produktów.

Siedem **Wniosków** zgromadzonych na stronie 171 odzwierciedla najważniejsze wyniki i obserwacje zgromadzone w toku prac wykonanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. Jednak w moim odczuciu warto może włączyć wniosek dotyczący wysokiej przeżywalności bakterii mlekowych podczas pasażu żołądkowo-jelitowego (Tab. 30-34), co podnosi znacząco wartość produktów. We wnioskach ująłbym również bardzo interesujące wyniki wpływu produktów na



liczebność prawidłowych i potencjalnie patogennych drobnoustrojów pobranych od pięciu grup pacjentów (analizy trawień *in vitro* w „jelicie grubym”, Tab. 35-44). We wnioskach brakuje mi bardziej szczegółowego odniesienia się do każdego z pięciu produktów finalnych. Na przykład, Autorka wykazała, że pod względem liczebności bakterii fermentacji mlekowej produkty dla dzieci z GAPS i dla sportowców nie wykazywały stabilności w czasie całego założonego okresu przechowywania co nie zostało powiedziane we wniosku 6.

## 5. Inne spostrzeżenia jakie poczyniłem w czasie analizowania pracy:

1. Czy nie należało rozważyć wykonania analizy sensorycznej podczas komponowania produktów, ponieważ produkty mogły potencjalnie nie różnić się istotnie statystycznie cechami prozdrowotnymi ale mogły różnić się pod względem akceptacji konsumenckiej?
2. Niewłaściwe w moim odczuciu sformułowania użyte w pracy:
  - str. 8: „zgubienie wagi”- waga to urządzenie, sugerowałbym np. „redukcja masy ciała”;
  - str. 9: „mikroorganizmy posiadające korzystne działanie”- sugerowałbym np. „mikroorganizmy wykazujące korzystne działanie”;
  - str. 17: , tytuł Tab. 3 „minerały” proponuję zastąpił terminem „składniki mineralne”;
  - str. 18: „część z nich (tj. witamin) posiada silne właściwości”, str. 22: „owoce mają zdolność”, str. 23: „kwas askorbinowy i tokoferol posiada zdolność...”, str. 37, 38 „*L. acidophilus* posiada właściwości immunomodulacyjne...”; str 38: „Ponadto posiada potencjał antymikrobiologiczny wobec drożdży *Candida*”, str. 48 „Glutamina również posiada taką zdolność..”;
  - str. 26: „Obniża cholesterol oraz trójglicerydy”, str. 27 „wzrost wewnątrzkomórkowego glutationu”; str 67: „Cukry, alkohole oraz kwasy organiczne oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej...”;
  - str. 84: „...przygotowano zmodyfikowane podłoże MRS, w którym glukozę zastąpiono sacharydem”.
    - obniżenie a nie „spadek” (np. str. 136, 138, 141, 143 i w innych miejscach);
    - Autorka używa wielokrotnie słowa „potencjał” – proponuję słowo „aktywność” bo potencjał to pojęcie z dziedziny elektrochemii;
    - w spisie literatury: Ahrens i in. – niepełne dane literaturowe.
    - brak w spisie literatury pracy Park i in. (2019), Xu i Xu (2014), Oliveira i in. (2016), Ghizzi i in. (2022);

Pytania, sugestie i uwagi umieszczone w całej powyższej recenzji nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej pracy, którą oceniam wysoko. Wskazanie ich jest jednak obowiązkiem recenzenta a spostrzeżenia te mogą być pomocne w czasie przygotowywania artykułów naukowych i publikowania wyników.

## 6. Wniosek końcowy

Przedłożona do recenzji praca Pani mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil jest oryginalnym i wartościowym studium z zakresu technologii żywności i żywienia człowieka o znaczeniu wdrożeniowym. Autorka zastosowała rozległe badania, pracochłonne i żmudne w opracowaniu.



Praca stanowi logiczną, przemyślaną całość o wysokim poziomie merytorycznym i cennych elementach nowości naukowej, które podkreśliłem w recenzji. Praca stanowi wartość zarówno pod względem analitycznym jak i aplikacyjnym. We wniosku końcowym stwierdzam że rozprawa Pani mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil pt. „Wdrożenie nowej linii produktów prozdrowotnych zawierających kwas alfa-ketoglutarowy” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w myśl art. 13., ust. 1 Ustawy z dn. 13.03 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) (Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261), w związku z art. 179 ust. 2 i 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.: Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669) oraz Rozp. Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych (Dz.U. z 2018 r. poz. 1818).

Składam Radzie Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wnioski o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil do dalszych etapów procedowania przewodu doktorskiego.

*Prof. dr hab. Szymgier*

