



UNIwersytet  
Przyrodniczy  
we Wrocławiu

KATEDRA CHEMII ŻYwności I BIOKATALIZY

Prof. dr hab. inż. Edyta Kostrzewa-Susłow  
e-mail: [edyta.kostrzewa-suslow@upwr.edu.pl](mailto:edyta.kostrzewa-suslow@upwr.edu.pl)  
tel. +48 713205195

Wrocław, 12.01.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil zatytułowanej  
„Wdrożenie nowej linii produktów prozdrowotnych zawierających kwas alfa-  
ketoglutarowy”**

Praca doktorska mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Darii Szymanowskiej. Praca powstała w wyniku realizacji II edycji konkursu w programie MNiSW „Doktorat wdrożeniowy” realizowanego na WNoŻiŻ UPP w latach 2018-2022 na podstawie umowy nr 0019/DW/2018/02 zawartej w dn. 29.01.2019 r. pomiędzy Ministrem Nauki i Szkolnictwa Wyższego a Wydziałem Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, we współpracy z firmą Living Food Sp. z o.o. z siedzibą w Trzcielu. Ze strony firmy funkcję opiekuna pomocniczego pełnił Pan Jędrzej Soporowski.

W ostatnich latach obserwujemy dynamiczny rozwój w opracowywaniu oraz produkcji funkcjonalnych wyrobów żywnościowych. Fermentowane napoje niemleczne doskonale wpisują się w ten trend. Fermentacji poddaje się warzywa, owoce, herbatę, surowce zbożowe, które są doskonałym źródłem związków o udowodnionym działaniu prozdrowotnym. Dodatkowo wyroby te są coraz częściej fermentowane przez bakterie probiotyczne. Otrzymywana w ten sposób żywność funkcjonalna charakteryzuje się wysoką wartością żywieniową i odpowiednimi właściwościami sensorycznymi. Za stosowaniem fermentowanych napojów przemawia również długa tradycja produkcji takich wyrobów oraz bezpieczeństwo spożywania. Zwiększenie asortymentu fermentowanych napojów bezalkoholowych i niemlecznych jest korzystne nie tylko dla osób stosujących diety bezmięsne, ale daje możliwość wzbogacenia diety szerszemu gronu



konsumentów. Przedstawiona mi do recenzji praca stanowiąca opracowanie nowych produktów prozdrowotnych o specjalnie dobranym składzie dopasowanym do szczególnego zapotrzebowania organizmów z deficytami w sposób szczególny wpisuje się w ten nurt badań.

Stanowiące przedmiot badań, opracowanie receptury produktów probiotycznych o konsystencji płynnej wzbogaconych kwasem alfa-ketoglutarym, kompleksem witaminowo-mineralnym oraz związkami polifenolowymi pochodzącymi z surowców roślinnych, wykonanie badań nad funkcjonalnością i przeprowadzenie procesu komercjalizacji uznaję za jak najbardziej uzasadnione.

Przedstawiona do oceny dysertacja jest opracowaniem naukowym liczącym 217 stron zaopatrzoną w 58 tabel, 86 rysunków oraz 306 pozycji piśmiennictwa. Rozprawa została podzielona na 6 rozdziałów obejmujących: wstęp, cel pracy, część literaturową, materiały i metody, wyniki i dyskusję oraz wnioski. Konstrukcję pracy uzupełniają zamieszczone na końcu dysertacji, syntetycznie napisane „Streszczenie”, w którym Doktorantka przedstawia oprócz przesłanek do podjęcia badań, najistotniejsze wyniki swojej pracy. Pomocnym narzędziem poprawiającym ogólny odbiór rozprawy oraz sprawne analizowanie wyników badań jest zamieszczony na początku pracy wykaz stosowanych skrótów. W pracy zabrakło mi wykazu tabel i rycin, co zwłaszcza przy dużej ilości prezentowanych wyników ułatwiłoby ponowne odszukanie istotnych informacji. Swoistym uwieńczeniem pracy wdrożeniowej polegającej na stworzeniu spersonalizowanych produktów przeznaczonych dla konkretnych grup odbiorców jest pięć zamieszczonych na końcu pracy instrukcji technologicznego otrzymywania płynnego produktu probiotycznego zawierającego kwas alfa-ketoglutarym.

Wprowadzeniem do opisu zrealizowanych badań jest 43-stronnicowa „Część literaturowa”, która została podzielona na cztery części. W pierwszej części zatytułowanej „Żywność funkcjonalna i suplementy diety w świetle prawa” autorka podejmuje się zdefiniowania w aspekcie prawnym pojęcia żywności funkcjonalnej, produktu leczniczego, suplementu diety oraz żywności specjalnego przeznaczenia medycznego. W kolejnej części charakteryzuje wybrane surowce roślinne, opisuje ich właściwości prozdrowotne, skupia się na ich aktywności antyoksydacyjnej. Zaznajamia czytelnika z pojęciem stresu oksydacyjnego i wywołujących go reaktywnych form



tłenu, uznając stres oksydacyjny za element etiologii chorób przewlekłych. Przedstawia czytelnikowi jedynie „drugą/złą twarz” RFT nieco zapominając, że podstawowe RFT tj. tlen singletowy, anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru oraz rodnik hydroksylowy wykazują istotną, pozytywną rolę w organizmie w trakcie wydzielania hormonów, skurczów mięśni, regulacji napięcia naczyniowego, aktywności bakteriobójczej. Ostatecznie Doktorantka jako remedium na stres oksydacyjny proponuje dietę bogatą w surowce roślinne zawierające antyoksydanty, przede wszystkim karotenoidy i polifenole. W dalszej części w sposób uporządkowany, w tabelach przedstawia źródła składników mineralnych, witamin oraz ich funkcje. Uwieńczeniem „Części literaturowej” jest obszerna charakterystyka, można by rzec katalog, 46 wybranych surowców roślinnych o właściwościach prozdrowotnych, które zostały wybrane do komponowania mieszanek roślinnych poddawanych fermentacji w części eksperymentalnej. Trzecią część „literaturową” recenzentka określiła jako „mikrobiologiczną”, ponieważ czytelnik odnajduje tam charakterystykę bakterii probiotycznych, z akcentem postawionym na cechy funkcjonalne, technologiczne oraz bezpieczeństwo stosowania tychże. W ostatniej części Autorka prezentuje właściwości fizykochemiczne kwasu alfa-ketoglutazarowego, jego aktywność plejotropową, by na końcu dokonać porównania metod chemicznej, enzymatycznej oraz mikrobiologicznej syntezy AKG. Podaje wady i zalety w/w metod. Na podstawie przytoczonych danych literaturowych, z uwzględnieniem liczby etapów prowadzących do uzyskania AKG, wydajności procesu oraz kosztochłonności wskazuje jako najkorzystniejszą – syntezę mikrobiologiczną.

W opinii recenzentki ta część pracy prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki ściśle skorelowaną z częścią doświadczalną, opisaną w dalszej części dysertacji. Generalnie rozdział ten napisany jest ciekawie i wskazuje na dobrą orientację Doktorantki w omawianym temacie, można w nim jednak odnaleźć kilka nieścisłości lub elementów wartych wyjaśnienia, które z obowiązku recenzentki wymieniam poniżej:

- proszę o wyjaśnienie, które z pojęć (produkt leczniczy, suplement diety czy żywność specjalnego przeznaczenia medycznego) najprecyzyjniej określa skomponowane w ramach pracy doktorskiej płynne produkty probiotyczne wzbogacone kwasem alfa-ketoglutazarowym.



- Str. 15 (Tabela 1)

-Sposób przedstawienia związków flawonoidowych oraz kwasów fenolowych budzi moje wątpliwości. Zamieszanie w odbiorze powodują niedoprecyzowane podstawniki, oznaczone na rysunkach – R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>. W przypadku kiedy stosuje się tego typu oznaczenia należy podać rodzaj podstawnika, który kryje się pod odpowiednim oznaczeniem.

-W drugiej (dolnej części tabeli 1) klasyfikującej kwasy fenolowe nieprecyzyjnie zostały sformułowane nazwy pierwszych dwóch klas – „kwas hydroksybenzoesowy”, „kwas hydroksycynamonowy”. Sugeruję aby kwas galusowy, kwas kawowy, kwas ferulowy zaliczyć do kwasów fenolowych i szczegółowiej ich nie klasyfikować aby nie doprowadzić do niepotrzebnych nieścisłości.

-Stilbeny i lignany nie są kwasami fenolowymi, bliżej im do polifenoli.

-W słowie „katechiny” proszę usunąć literę „n”.

- Str. 41, wers 10 – zdanie „Dodatkowo, odwracalny transfer grupy aminowej (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) z glutaminianu do szczawiooctanu prowadzi również do tworzenia AKG (i asparaginianu)” sugeruję poprawić następująco „Dodatkowo, odwracalny transfer grupy -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> z glutaminianu do szczawiooctanu prowadzi również do tworzenia AKG (i asparaginianu)”.

- Str. 42, wers 18 – zdanie wymaga drobnej poprawki, proponuję: „AKG jest ważną cząsteczką biologiczną, która odgrywa kluczową rolę w wielu szlakach metabolicznych i komórkowych”.

- Str. 45, wers 15 – w zdaniu „W reakcji hydroksylacji jeden atom tlenu z O<sub>2</sub> zostaje przyłączony do grupy hydroksylowej w substracie, podczas gdy drugi jest przyłączony przez AKG, co prowadzi do dekarboksylacji AKG i powstaniu ditlenku węgla oraz bursztynianu (Rys. 4)” – słowo „bursztynianu” powinno być zamienione na „kwasu bursztynowego”.



- Str. 49, wers 13 – w zdaniu „...poddano reakcji z roztworem wodorotlenku, aby otrzymać roztwór wodny kwasu alfa-ketoglutarynowego” – proszę doprecyzować **jaki wodorotlenek** brał udział w reakcji.
- Str. 49, wers 20 – zdanie wymaga delikatnej zmiany stylistycznej, proponuję: „... konieczna jest obecność pięciu enzymów (UDH, GlucD, KdgD, KgsalDH i NOX), kofaktora NAD<sup>+</sup> oraz jonów Mg<sup>2+</sup>”.
- Str. 49, wers 22 – zdanie wymaga delikatnej zmiany stylistycznej, proponuję: „Pierwszym enzymem szlaku jest dehydrogenaza uronianowa (UDH). Utlenia ona kwas glukuronowy do glukaratu.....”.
- Str. 50 – W celu ujednolicenia całej pracy nazwy związków przedstawione na rysunku 8 powinny być w języku polskim.
- Str. 51, wers 7 – „liczy etapów” proszę zamienić na „liczby etapów”.

Założenia i cel pracy zostały jasno sformułowane, a koncepcja rozwiązania problemu badawczego przedstawiona w sposób klarowny.

W części eksperymentalnej zatytułowanej „Materiały i metody” Autorka w postaci precyzyjnie skonstruowanych tabel zaopatrzonych w zdjęcia prezentuje skład jakościowo-ilościowy mieszanek roślinnych skomponowanych dla osób po antybiotykoterapii, po chemioterapii, dzieci z zespołem GAPS, przyszłych mam oraz sportowców. Dla poszczególnych grup osób proponuje po 5 wariantów mieszanek roślinnych.

W dalszej części pracy w sposób równie przejrzysty przedstawia skład gatunkowy zestawów bakterii fermentacji mlekowej zaproponowanych dla pięciu w/w grup odbiorców. Następnie podaje składy podłoży mikrobiologicznych, opisuje sposób przeprowadzenia ekstrakcji mieszanek roślinnych, oznaczeń zawartości polifenoli ogółem oraz potencjału przeciwrodnikowego.

Następnie Autorka opisuje wykorzystane w badaniach metody mikrobiologiczne polegające na przygotowaniu inokulum bakterii fermentacji mlekowej, inokulum drożdży, oznaczaniu liczebności drobnoustrojów oraz oznaczaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Opisuje sposób prowadzenia testów fermentacyjnych na modelach mieszanek roślinnych. W dalszej



części oprócz wykorzystanych metod analitycznych koncentruje się na opisie doświadczeń polegających na ocenie efektywności wzrostu bakterii fermentacji mlekowej w podłożach laboratoryjnych i przemysłowych. Dwa istotne elementy tej części dysertacji stanowi opis mikrobiologicznej syntezy kwasu alfa-ketoglutazarowego przez drożdże *Yarrowia lipolitica* uwzględniający wpływ stężenia glicerolu, tiaminy i soli mineralnych oraz parametrów procesu na biosyntezę AKG, a także przeprowadzone badania z wykorzystaniem modelu trawienia *in vitro*, które pozwoliły na określenie wpływu trawienia na stabilność liczby drobnoustrojów probiotycznych oraz wpływu na skład ilościowo-jakościowy mikrobiomu prawidłowego i patologicznie zmienionego. Wartym podkreślenia elementem tej części pracy jest przedstawiony na stronie 74 schemat prac badawczych prowadzących do otrzymywania nowej linii produktów prozdrowotnych.

W kolejnym rozdziale „Wyniki i dyskusja” Doktorantka w sposób syntetyczny przy wykorzystaniu metod graficznych ilustruje w postaci rysunków i tabel wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań. Na szczególne wyróżnienie zasługuje dojrzały sposób prowadzenia dyskusji badań własnych z wiedzą dostępną w literaturze fachowej. Autorka swobodnie i świadomie porusza się w realizowanej tematyce badawczej czego konsekwencją w pierwszym etapie badań była umiejętnie przeprowadzona analiza właściwości prozdrowotnych ekstraktów oraz wyników procesu namnażania i fermentacji, dzięki której do dalszych etapów badań wybrano po 2 modele mieszanek roślinnych dla każdej z grup odbiorców.

Niezwykle pracowitą częścią badań były testy dzięki którym wyznaczono wzrost odpowiednich bakterii fermentacji mlekowej w podłożach zawierających [REDACTED] melasy trzcinowej. Dowiedzono, iż wykorzystane w badaniach gatunki bakterii fermentacji mlekowej posiadają potencjał do wykorzystania obecnych w melasie cukrów na potrzeby wzrostu biomasy ( $10^{11}$  jtk/mL) oraz produkcji kwasu mlekowego w stężeniu 20-34 g/L. ●

[REDACTED]

Na szczególne podkreślenie zasługuje dojrzałość młodej Badaczki, którą postawiona hipoteza zakładająca uzyskanie lepszych właściwości prozdrowotnych produktów poprzez wykorzystanie



w procesie fermentacji **kultury mieszanej** drobnoustrojów, doprowadza do wielu interesujących obserwacji. Najwyższą liczebność drobnoustrojów ( $6.4 \times 10^{12}$  jtk/mL) uzyskuje w 72 h hodowli w wariacie, którego skład był przeznaczony dla osób po antybiotykoterapii a zestaw bakterii był złożony z gatunków *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *Streptococcus thermophilus*, *L. helveticus*, *L. jenseni* oraz *S. salivarius*. Najwyższe stężenie kwasu mlekowego (27,4 g/L) uzyskuje w 366 h hodowli w wariacie, którym skład był dedykowany osobom po chemioterapii, a zestaw bakterii był złożony z gatunków *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *B. animalis*, *S. thermophilus*, *L. helveticus*, *L. jenseni* oraz *S. salivarius*. Wskazuje także zestaw bakterii, który najdłużej zachował żywotność, było to połączenie *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *B. animalis*, *S. thermophilus* oraz *L. jenseni*.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil zaliczam:

- Wytypowanie - na podstawie wyników efektywności wzrostu bakterii probiotycznych w podłożu produkcyjnym zawierającym wybrane surowce roślinne oraz zawartości związków polifenolowych - mieszanki surowców roślinnych, po jednej dla każdej z grup odbiorców, stanowiących podstawę do produkcji innowacyjnego preparatu probiotycznego. Dla osób po antybiotykoterapii, model A1 o następującym składzie: acerola liofilizowana, mąka z topinambura, zmielonych pestek granatu, lucumy, imbiru, baobabu oraz maitake.

Dla osób po chemioterapii, model C2 o następującym składzie: białko konopne, burak liofilizowany, młody jęczmień, pokrzywa liofilizowana, lucuma, anyż. Dla dzieci z zespołem GAPS, model G2 o następującym składzie: truskawka liofilizowana, malina liofilizowana, mleko kokosowe liofilizowane, czarna porzeczka liofilizowana. Dla przyszłych mam, model M2 o następującym składzie: błonnik pokarmowy aroniowy, pokrzywa liofilizowana, jeżyna liofilizowana, mąka lniana, ekstrakt z pomidora. Dla sportowców, model S2 o następującym składzie: burak liofilizowany, białko ryżowe, młody jęczmień, pokrzywa liofilizowana, skórka z dzikiej róży, ashwagandha.



- Wskazanie drożdży z gatunku *Y. lipolytica* [REDACTED] jako wydajnego biokatalizatora zdolnego do syntezy kwasu alfa-ketoglutazarowego.
- Określenie kluczowych elementów procesu, które warunkują efektywną syntezę kwasu alfa-ketoglutazarowego, czyli optymalnego składu jakościowo-ilościowego podłoża produkcyjnego.

[REDACTED]

- Ocenę biofunkcjonalności produktów poprzez określenie stabilności i efektywności działania substancji bioaktywnych, soli mineralnych oraz mikroorganizmów z wykorzystaniem modelu trawienia *in vitro*.

- Opracowanie bezemisyjnej i energooszczędnej technologii produkcji napojów probiotycznych wzbogaconych kwasem alfa-ketoglutazarowym zgodnej z zasadami zrównoważonego rozwoju.

Mimo ogólnie bardzo pozytywnego wrażenia, co do uzyskanych wyników i ich prezentacji, pozwalam sobie mieć kilka pytań, sugestii i uwag do tej części pracy. Wymieniam je poniżej.

- Proszę o wyjaśnienie jakie parametry/czynniki były brane pod uwagę przy doborze surowca w trakcie komponowania poszczególnych modeli mieszanek roślinnych.
- Czy rozważano ewentualny dobór metod ekstrakcji mieszanek roślinnych?
- Na stronie 119 czytamy "Ponadto literatura przedmiotu wskazuje, że proces fermentacji surowców roślinnych przyczynia się do zwiększenia biodostępności składników funkcyjnalnych jak polifenole (Mapelli-Brahm i in. 2020)". Proszę o wyjaśnienie mechanizmów odpowiadających za zwiększenie biodostępności polifenoli w trakcie lub po procesie fermentacji.
- Jakie parametry bierze się pod uwagę przy szacowaniu kosztocłonności procesu mikrobiologicznej syntezy kwasu alfa-ketoglutazarowego?
- Poza pierwszym użyciem, nie powinno się podawać w tekstach naukowych pełnej nazwy rodzajowej i gatunkowej bakterii czy drożdży – dotyczy całej pracy.





- Strona 126, wers 16 – tiamina została niepoprawnie nazwana aminokwasem. Tiaminę (witamina B1) można ze względu na strukturę cząsteczki zaliczyć do amin.
- Str. 135, wers 16 – w słowie „powiększania” brakuje „a”

Sygnalizowane w recenzji pewne niejasności czy sugestie nie wpływają na wartość i pozytywny odbiór pracy. Praca jest napisana logicznie, wzbogacona graficznie rysunkami, poprawna językowo i stylistycznie (dopatrzyłam się zaledwie kilku błędów stylistycznych, a ilość „literówek” jest niewielka). Rozprawa zawiera elementy nowości naukowej, a wymienione powyżej uwagi polemiczne i pytania nie umniejszają ocenie recenzowanej pracy. Przedstawione w dysertacji rezultaty świadczą o dobrym opanowaniu technik badawczych. Autorka wykazała się zdolnością prowadzenia własnych studiów literaturowych, krytyczną oceną faktów, interpretacją wyników oraz jasnym formułowaniem wniosków.

Konkludując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego polegające na opracowaniu oraz wdrożeniu nowej linii produktów prozdrowotnych zawierających kwas alfa-ketoglutaryny, odpowiadając na zapotrzebowanie rynku produktów spożywczych specjalnego przeznaczenia. Oryginalność, wiedza teoretyczna, samodzielność i umiejętności wykonawcze Doktorantki wskazują na jej dojrzałość naukową. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Maciejewskiej-Gil do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*E. Kostrzewska-Susłowa*  
prof. dr hab. inż. Edyta Kostrzewska-Susłowa