Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
W POZNANIU

WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIU

dr hab. inż. Anna Olejnik, prof. UPP
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

Poznań, 8 sierpnia 2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
pt „Badanie wpływu opornej dekstryny na wybrane markery zdrowotne *in vitro* oraz *in vivo*"
mgr inż. Michał Włodarczyk

Praca doktorska została wykonana na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Katarzyny Śliżewskiej jako Promotora oraz prof. uczelni, dr hab. Renaty Barczyńskiej-Felusiak pełniącej funkcję Promotora pomocniczego

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała nr 65/2023 Rady do Spraw Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia z dnia 20 czerwca 2023 r. oraz pismo Pani Prodziekan ds. Kształcenia Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej prof. uczelni dr hab. inż. Edyty Kordialik-Bogackiej z dnia 27 czerwca.2023 r.

1. Podstawowe dane o kandydacie

Mgr inż. Michał Włodarczyk ukończył studia 19 lipca 2019 roku na kierunku Biotechnology w Centrum Kształcenia Międzynarodowego Politechniki Łódzkiej uzyskując tytuł naukowy magistra. W latach 2019-2023 był uczestnikiem studiów doktoranckich w Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej Politechniki Łódzkiej w dyscyplinie Technologia żywności i żywienia. Na trzecim i czwartym roku studiów doktoranckich mgr inż. Michał Włodarczyk był stypendystą programu POWER w ramach Projektu „Zintegrowany Program Politechniki Łódzkiej – edycja II". Ponadto, uczestniczył w realizacji projektu NCBiR (POIR.04.01.02-00-0102/17-00) pt. „Opracowanie i wdrożenie innowacyjnej technologii produkcji przetworów warzywno-owocowych nowej generacji wzbogaconych błonnikowym preparatem ze skrobi ziemniaczanej o właściwościach prebiotycznych z przeznaczeniem dla dzieci i młodzieży".

Zainteresowania badawcze mgr inż. Michała Włodarczyka dotyczą zagadnień związanych z probiotykami, prebiotykami i ich znaczeniem w prewencji i terapii otyłości. Doktorant jest współautorem czterech artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych. Dwie prace mają charakter eksperymentalny i raportują wyniki badań będące podstawą rozprawy doktorskiej. Pozostałe dwa artykuły stanowią przegląd literatury ściśle związany z obszarem

Olejnik

zainteresowań Doktoranta. Mgr inż. Michał Włodarczyk brał czynny udział w konferencjach naukowych, prezentując jako autor wiodący swoje osiągnięcia i zdobywając nagrody w dziedzinie związanej z tematyką pracy doktorskiej.

Zgodnie ze złożonym oświadczeniem, mgr inż. Michał Włodarczyk nie ubiegał się w latach poprzednich o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie Technologia żywności i żywienia.

2. Informacje o pracy doktorskiej

Rozprawa doktorska przedłożona do oceny obejmuje 164 strony maszynopisu w języku angielskim i ma układ typowy dla prac o charakterze badawczym. Monografia składa się z sześciu rozdziałów głównych, do których należą: 1) Wprowadzenie, 2) Cel i hipotezy badań, 3) Metodologia, 4) Wyniki i dyskusja, 5) Wnioski i podsumowania końcowe oraz 6) Bibliografia. Praca zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim. Treść rozprawy poprzedzona jest spisem treści. Monografia zawiera 49 rycin; z czego 36 rycin przedstawia wyniki badań własnych a pozostałe służą do graficznego zobrazowania zagadnień omawianych we wprowadzeniu. W pracy zamieszczono również 28 tabel, w tym 8 tabel we wprowadzeniu w celu zestawienia i podsumowania rezultatów badań publikowanych w literaturze, 14 tabel w części metodycznej i 6 tabel z zestawieniem danych eksperymentalnych w części wynikowej. Bibliografia obejmuje 348 pozycji literaturowych. Rozprawa zawiera wszystkie niezbędne elementy i pod względem formalnym nie budzi żadnych zastrzeżeń.

Tematyka pracy i jej znaczenie

Praca doktorska mgr inż. Michała Włodarczyka pt. „Badanie wpływu opornej dekstryny na wybrane markery zdrowotne *in vitro* oraz *in vivo*" dotyczy oceny właściwości prebiotycznych opornej dekstryny ze skrobi ziemniaczanej jako funkcjonalnego dodatku do produktów warzywno-owocowych przeznaczonych dla dzieci z nadwagą i otyłością.

Otyłość i związane z nią zaburzenia metaboliczne stanowią poważny problem zdrowotny, który oprócz populacji osób dorosłych dotyczy coraz liczniejszej grupy dzieci. Badania ostatnich lat wskazują na związek otyłości z dysbiozą jelitową i dokumentują znaczący wpływ mikrobioty jelitowej na masę ciała, wrażliwość na insulinę, czy gospodarkę węglowodanowo-lipidową. Zatem działanie mające na celu modulowanie profilu mikrobioty jelitowej poprzez promowanie rozwoju mikroorganizmów probiotycznych ma istotne znaczenie w prewencji i terapii otyłości. Opracowanie produktów funkcjonalnych o udowodnionym działaniu prozdrowotnym jest ważnym zadaniem badawczym o dużym znaczeniu aplikacyjnym. Dlatego uważam, że podjęcie omawianej w rozprawie tematyki jest w pełni zasadne z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego. Zagadnienia będące

podstawą dysertacji mgr inż. Michała Włodarczyka dobrze wpisują się w nowoczesne trendy w nauce o żywności i żywieniu.

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały wykonane w ramach projektu NCBiR pt. „Opracowanie i wdrożenie innowacyjnej technologii produkcji przetworów warzywno-owocowych nowej generacji wzbogaconych błonnikowym preparatem ze skrobi ziemniaczanej o właściwościach prebiotycznych z przeznaczeniem dla dzieci i młodzieży", co również potwierdza istotność tematyki pracy doktorskiej dla rozwoju nauki i społeczeństwa.

Ocena merytoryczna pracy

Praca doktorska mgr inż. Michała Włodarczyka obejmowała analizę właściwości prebiotycznych opornej dekstryny ze skrobi ziemniaczanej w celu jej oceny jako funkcjonalnego dodatku do produktów warzywno-owocowych, które poprzez modulowanie profilu mikrobioty jelitowej mają wspomagać redukcję masy ciała i poprawę parametrów zdrowotnych u dzieci z nadwagą i otyłością. Badania nad potencjałem opornej dekstryny były prowadzone w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem szczepów bakterii jelitowych (*Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacteroides, E. coli, Enterococcus, Clostridium*) izolowanych z próbek kału pobranych od dzieci w wieku od 3 do 17 lat. Dekstrynę oceniano w aspekcie promowania wzrostu bakterii probiotycznych, wytwarzania kwasu mlekowego oraz krótkołańcuchowych i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (SCFA: mrówkowego, octowego, propionowego, masłowego, walerianowego i BCFA: izomasłowego i izowalerianowego) oraz wpływania na aktywność enzymów kałowych (α-glukozydazy, β-glukozydazy, α-galaktozydazy, β-galaktozydazy i β-glukuronidazy). Drugi etap pracy obejmował analizy próbek kału pobranych od dzieci z nadwagą i otyłością oraz od dzieci z prawidłową masą ciała suplementowanych przez 6 miesięcy produktami warzywno-owocowymi wzbogaconymi w oporną dekstrynę lub glukozę w grupie kontrolnej. Oceniano wpływ suplementacji na zawartość w kale kwasu L- i D-mlekowego, kwasów tłuszczowych SCFA i BCFA oraz aktywność enzymów fekalnych.

Rozprawę doktorską otwiera wstęp literaturowy, który stanowi szczegółowe wprowadzenie do zagadnień podejmowanych w części eksperymentalnej i dobre uzasadnienie wyboru tematyki dysertacji. W pierwszej części przeglądu piśmiennictwa, Autor przedstawił charakterystykę mikrobioty przewodu pokarmowego i jej podstawowe funkcje, opisał proces kształtowania mikrośrodowiska jelitowego ze wskazaniem czynników wpływających na rozwój mikrobioty na różnych etapach życia oraz przedyskutował istotny wpływ składników diety na profil mikrobioty jelitowej. Druga część wprowadzenia została poświęcona opornej skrobi i opornej dekstrynie, z podaniem między innymi ich definicji, źródeł, właściwości i efektów zdrowotnych. W kolejnych podrozdziałach Autor przedstawił narastający problem nadwagi i otyłości w populacji osób dorosłych

i dzieci, przytaczając dane statystyczne, dokumentując wysokie koszty leczenia otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych i chorób sercowo-naczyniowych. W ostatniej części wprowadzenia, omówiono związki przyczynowo-skutkowe pomiędzy otyłością a dysbiozą jelitową, dowodząc w oparciu o dane literaturowe, jak istotny wpływ mają zaburzenia homeostazy mikrośrodowiska jelitowego na patogenezę otyłości i chorób jej towarzyszących.

Przegląd piśmiennictwa jest bardzo obszernym opracowaniem, zamieszczonym na 42 stronach, które zajmuje ok. 29% objętości pracy, z wyłączeniem bibliografii. Literaturowa część dysertacji stanowi dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej i wskazuje na dużą wiedzę Autora oraz gruntowną znajomość zagadnień związanych z tematyką pracy doktorskiej.

W rozdziale 2 monografii Autor przedstawił cel i zakres badań oraz hipotezy badawcze. Główny cel pracy został określony bardzo ogólnie, jako zbadanie działania opornej dekstryny *in vitro* i *in vivo*. Uważam, że cel pracy mógłby być określony bardziej precyzyjnie lub doprecyzowany przez podanie celów szczegółowych. Zamieszczony opis przeprowadzonych badań i ich zakres wyjaśnia w jaki sposób realizowano cel i oceniano potencjał prebiotyczny opornej dekstryny. Autor prawidłowo sformułował 6 hipotez badawczych, z których pierwsze trzy dotyczą części eksperymentalnej *in vitro*, a kolejne trzy dotyczą badań *in vivo*, obejmujących analizy próbek kału pobranych przed i po interwencji żywieniowej.

Rozdział 3 w dysertacji przedstawia metodologię badań. Na początku rozdziału, w tabeli 9, zamieszczono wykaz przeprowadzonych badań i analiz, ze wskazaniem rozdziałów zawierających opis zastosowanej metody badawczej i uzyskanych wyników. Informacje zawarte w tabeli 9 jednoznacznie pokazują zakres badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej. Rozdział pt. „Metodologia" jest obszerny; zawiera szczegółowe dane dotyczące materiałów badawczych, dokładne opisy eksperymentów, zastosowanych metod analitycznych i statystycznej analizy wyników badań. Mam uwagę odnośnie przygotowania prób biologicznych do analiz zawartości kwasów tłuszczowych (SCFA, BCFA i kwasu mlekowego) metodą HPLC. W rozdziale 3.4.1. podano, że próby przed analizą HPLC deproteinizowano przy zastosowaniu filtracji przez filtry o porowatości 0,22 μm. Filtracja przez membrany, nawet te wiążące białka, nie jest skuteczną metodą odbiałczania. Zwykle przeprowadza się wytrącanie białka, po czym następuje wirowanie i/lub filtracja. Kolejne moje pytanie dotyczy wyizolowanych z próbek kału bakterii, zastosowanych w badaniach opornej dekstryny *in vitro*. W rozdziale 3.1.2. nie wspomniano o identyfikacji wyizolowanych szczepów bakterii. W opisie metod analizy statystycznej (rozdział 3.7.) zamieszczono informację, że każdy pomiar wykonano w trzech powtórzeniach, a pokazane wyniki stanowią średnie ± odchylenie standardowe (SD). Jeśli trzykrotne powtórzenie pomiaru dotyczyło tej samej próby, to prawidłowym byłoby podanie standardowego błędu pomiaru ± SEM (*standard error of measurement*) i rozróżnienie w pracy parametrów SD i SEM w zależności od rodzaju analizy.

W opisie metod statystycznych nie ma informacji odnośnie ilości powtórzeń eksperymentów prowadzonych na etapie badań *in vitro*. Brakuje również wskazania programu komputerowego, który zastosowano do statystycznej analizy danych.

W rozdziale 4 monografii szczegółowo opisano uzyskane wyniki, które zaprezentowano głównie na wykresach, w postaci średnich arytmetycznych z zaznaczeniem odchylenia standardowego. Wyniki zostały zestawione również w tabelach i stanowią rzetelną dokumentację przeprowadzonych eksperymentów i analiz. Każde zagadnienie badawcze zostało przedstawione w osobnym rozdziale z wydzielonymi sekcjami zawierającymi opis wyników, ich podsumowanie i dyskusję. Taka organizacja części doświadczalnej nadaje pracy przejrzystość i ułatwia jej czytanie, jednak wiąże się z powtórzeniami w tekście, których trudno uniknąć. Powtórzenia dotyczą również prezentacji danych eksperymentalnych, które są pokazane zarówno w sekcji omówienie wyników, jak i w sekcji podsumowanie, choć w innej formie, na wykresie innego typu. Na przykład, stężenie kwasu izowalerianowego oznaczone w próbkach kału pokazano na kolumnowym wykresie nr 37, stężenie kwasu izomasłowego na kolumnowym wykresie nr 38, a w podsumowaniu na wykresie nr 40 zestawiono średnie zawartości obu kwasów (jako suma BCFA) w formie wykresu kolumnowego skumulowanego. W pracach naukowych zwykle nie przedstawia się 2-krotnie tych samych danych. Podobna uwaga dotyczy również jednoczesnego zestawienia danych liczbowych w tabelach i ich graficznego zobrazowania na wykresach, jak ma to miejsce w przypadku tabeli 27 i wykresów 31-38, czy tabeli 28 i wykresów 42-46. Aby uniknąć powtórzeń a zachować pełną dokumentację wyników badań proponowałabym szczegółowe dane zamieścić w załącznikach do monografii lub jako materiały uzupełniające w przypadku publikacji.

Opis wyników prezentowanych w tabelach i na wykresach jest staranny, a analizowane korelacje pomiędzy badanymi parametrami są prawidłowo zinterpretowane. W opisie danych dotyczących wpływu opornej dekstryny na wzrost mikroorganizmów jelitowych w monokulturach i hodowli mieszanej natknęłam się jednak na pewną nieścisłość. Mianowicie, Autor niejednokrotnie wnioskuje o wpływie dekstryny na żywotność komórek bakterii jelitowych, natomiast w pracy nie oznaczano stricte żywotności komórek, lecz ich zdolność do namnażania. Metoda płytkowa Kocha jest powszechnie stosowaną metodą ilościowego oznaczania komórek bakterii, ale nie umożliwia detekcji komórek nienamnażających się i nie pozwala na określenie poziomu ich aktywności metabolicznej. Przy zastosowaniu tej metody nie można oznaczyć żywych komórek, które nie podejmują wzrostu, a mogą wykazywać określone właściwości.

Dyskusja wyników jest dobrze napisaną wartościową częścią rozprawy. Autor rzetelnie skonfrontował osiągnięcia własne z danymi publikowanymi w literaturze, nie pozostając bezkrytycznym w odniesieniu do badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Autor celnie wskazał aspekty, które mogły wpłynąć na rozbieżności w wynikach badań i w konsekwencji

trudności w ich interpretacji i poszukiwaniu korelacji. Uważam, że analiza jelitowej mikrobioty/mikrobiomu podczas badań żywieniowych, która nie wchodziła w zakres pracy doktorskiej, byłaby ważnym elementem w ustaleniu korelacji i opisaniu wpływu suplementacji warzywno-owocowym preparatem prebiotycznym na zmiany w ilości metabolitów i enzymów fekalnych produkowanych przez mikrobiotę.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w celu przygotowania dysertacji Autor zgromadził bardzo dużą bazę piśmiennictwa, składającą się z aktualnych źródeł literatury światowej, która obejmuje aż 348 pozycji cytowanych w pracy. System cytowania zastosowany w monografii jest niestandardowy; przy cytowaniu pozycji literatury w środku zdania, nazwisko pierwszego autora wraz z rokiem opublikowania znajduje się w nawiasie kwadratowym, na przykład: „*In research of* [Barczynska *et al.*, 2010, 2012] *prebiotic characteristics resistant dextrin derived from potato starch were also identified.*" Nietypowy system cytowania jest stosowany konsekwentnie w całej dysertacji.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant prawidłowo sformułował 9 wniosków szczegółowych i 1 wniosek końcowy o charakterze ogólnym, podsumowując, że dodatek opornej dekstryny ze skrobi ziemniaczanej do preparatu warzywno-owocowego może być realną strategią prowadzącą do poprawy wybranych wskaźników zdrowotnych u dzieci z nadwagą, korzystnie wpływającą na proces redukcji masy ciała.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana starannie pod względem merytorycznym i edytorskim, jednakże z obowiązku recenzenta podaję kilka drobnych błędów, na które zwróciłam uwagę podczas czytania pracy:

- w streszczeniu, w zdaniu " *In vitro* study aimed to evaluate the viability of resistant dextrin as a carbon source..." zamiast "the viability of resistant dextrin" powinno być "the suitability of resistant dextrin" (strona 3)
- brak pełnego cytowania Baczyńska et al. (2012) na stronie 86
- powinno być wheat zamiast what na stronie 86 (resistant dextrin from what or maize starch)
- brak wyjaśnienia niektórych skrótów zamieszczonych w pracy, głownie w tabelach, np. skróty MDA i RCT zamieszczono w tabeli 3 bez podania pełnej nazwy
- brak konsekwencji w stosowaniu skrótów, np. na oznaczenie cukrzycy typu 2 stosowano 3 określenia: type 2 diabetes, type-2 diabetes i skrót T2D (tabela 3). Podobnie skrót PI (prebiotic index) jest używany zamiennie z pełna nazwą. Skrót powinien być wprowadzony przy pierwszym pojawieniu się pełnej nazwy a następnie konsekwentnie stosowany w całej pracy. Zamieszczenie w pracy wykazu stosowanych skrótów pozwoliłoby uniknąć braków i ułatwiłoby czytanie tekstu.
- ostatnia rycina w monografii zamieszczona na stronie 145 posiada nieprawidłowy numer; zamiast Figure 48 powinno być Figure 49. Błąd dotyczy również cytowania ryciny w tekście pracy.

Podsumowując moją recenzję, uważam, że badania zrealizowane przez mgr inż. Michała Włodarczyka były dobrze zaplanowane, rzetelnie wykonane i starannie opisane w dysertacji. Obszerny przegląd piśmiennictwa, odpowiedni dobór metod badawczych oraz sposób analizy i interpretacji wyników badań świadczą o dużej wiedzy Doktoranta, Jego dojrzałości naukowej i umiejętności rozwiązywania problemu naukowego. Uważam, że oceniana dysertacja stanowi oryginalne, samodzielne rozwiązanie problemu naukowego i posiada istotną wartość poznawczą o dużym potencjale aplikacyjnym.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wartość naukową rozprawy, zawarte w niej elementy nowości naukowej i wysoki potencjał aplikacyjny wyników badań, stwierdzam, że dysertacja autorstwa mgr inż. Michała Włodarczyka spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Olejnik