

Dr hab. Magdalena Kowalczyk
Pracownia Biotechnologii Bakterii Mlekowych
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Warszawa, 24.08.2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. inż. Michała Włodarczyka
pt. „Study on effects of resistant dextrin on selected health markers *in vitro* and *in vivo*”
(w tłumaczeniu na język polski: “Badanie wpływu odpornej dekstryny na wybrane markery
zdrowotne *in vitro* oraz *in vivo*”)

wykonanej na Wydziale Biotechnologii Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem prof.
dr hab. inż. Katarzyny Śliżewskiej i dr hab. Renaty Barczyńskiej-Felusiak, prof. uczelni

Przygotowana przez mgr. inż. Michała Włodarczyka rozprawa doktorska dotyczy testowania odpornej dekstryny ze skrobi ziemniaczanej jako potencjalnego prebiotycznego dodatku do innowacyjnych preparatów warzywno-owocowych, które miałyby wspomagać odchudzanie dzieci z nadwagą oraz pozytywnie wpływać na wybrane markery zdrowotne poprzez indukowanie zmian w mikrobiocie jelitowej. Podjęta przez doktoranta tematyka badawcza dotyczy bardzo istotnego problemu dzisiejszych czasów, a mianowicie coraz częściej obserwowanej otyłości u dzieci i młodzieży spowodowanej nadmiernym spożywaniem pokarmów zawierających łatwo przyswajalne, wysokokaloryczne składniki odżywcze. Jednocześnie przedstawiono w pracy możliwości zapobiegania nadwadze i otyłości poprzez zastosowanie żywności funkcjonalnej korzystnie oddziałującej na mikrobiotę jelitową i utrzymanie prawidłowej masy ciała. Szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych zaczęto ostatnio zwracać uwagę na utrzymanie zdrowych nawyków żywieniowych, m.in. poprzez wzbogacanie diety w błonnik pokarmowy. W ten kierunek wpisują się badania prowadzone nad modyfikowanym błonnikiem – oporną dekstryną opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej. Zaletą tego typu błonników pokarmowych są właściwości prebiotyczne przy jednoczesnym braku niekorzystnego wpływu na właściwości sensoryczne żywności czy na układ pokarmowy człowieka.

Celem ocenianej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu odpornej dekstryny ze skrobi ziemniaczanej *in vitro* i *in vivo*. W związku z tym oceniono wpływ odpornej dekstryny na wybrane markery zdrowotne. Badania obejmowały m.in. oznaczenie profilu krótkołańcuchowych i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych oraz kwasu mlekowego. Ponadto oznaczono aktywność wybranych enzymów kałowych (α -glukozydazy, β -glukozydazy, α -galaktozydazy, β -galaktozydazy, β -glukuronidazy). Badania *in vitro* koncentrowały się na oznaczaniu ww. wskaźników zdrowotnych w

plynie pohodowlanym po wspólnej hodowli bakterii jelitowych wyizolowanych z próbek kału dzieci w podłożu hodowlanym wzbogaconym oporną dekstryną względem próby kontrolnej zawierającej glukozę. Badania *in vivo* obejmowały oznaczenie wspomnianych markerów zdrowotnych w próbkach kału dzieci, którym podawano preparat warzywno-owocowy wzbogacony dekstryną oporną ze skrobi ziemniaczanej.

Badania do niniejszej rozprawy były częściowo realizowane w ramach grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju 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” Grant nr POIR.04.01.02-00-0102/17-00 (PreSTFibre4Kids). Na uwagę zasługuje fakt, iż badania prowadzono we współpracy z Akademią im. Jana Długosza w Częstochowie, Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie oraz firmą TYMBARK–MWS w Tymbarku co podkreśla zainteresowanie tematem prowadzonych badań przez przedstawicieli jednostek naukowych, medycznych oraz przemysłu spożywczego i wskazuje na również aplikacyjny charakter badań.

Rozprawa doktorska przygotowana jest w formie monografii w języku angielskim a jej struktura jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim. Praca liczy 164 strony numerowane i zawiera 49 rycin i 28 tabel. Układ pracy jest klasyczny z podziałem na rozdziały i podrozdziały. Pracę otwiera streszczenie w języku polskim i angielskim, po czym kolejno następują: Wstęp, Geneza, cel i hipotezy badawcze, Metody, Wyniki i dyskusja, Podsumowanie i wnioski końcowe oraz Bibliografia, na którą składa się 348 pozycji.

W rozdziale 1 stanowiącym „Wstęp” Autor w syntetyczny sposób przedstawił aktualny stan wiedzy na temat mikrobioty przewodu pokarmowego opisując skład mikroflory jelitowej z uwzględnieniem różnych etapów życia człowieka oraz czynników odpowiedzialnych za jej tworzenie. Wśród nich szczególną uwagę poświęcił diecie, która ma ogromny wpływ na populację mikroflory, a nieprawidłowe nawyki żywieniowe mogą powodować dysbiozę jelitową, czyli zaburzenie równowagi mikrobiologicznej, co może prowadzić do powstawania szeregu chorób, w tym nowotworów, zaburzeń metabolicznych i otyłości. Następnie, Doktorant przedstawił znaczenie mikrobioty w utrzymaniu zdrowia i dobrego samopoczucia człowieka oraz wyjaśnił mechanizmy za pośrednictwem których mikroorganizmy pełnią szereg funkcji oddziałujących na metabolizm, system immunologiczny, czy utrzymanie bariery jelitowej. Ponadto, zaprezentował również potencjalnie szkodliwy wpływ niektórych mikroorganizmów na organizm gospodarza m.in. poprzez produkcję związków rakotwórczych. W dalszej części „Wstępu” Doktorant szczegółowo scharakteryzował dwa rodzaje błonnika pokarmowego – skrobię oporną zdefiniowaną jako skrobię i produkty uboczne jej rozkładu, które nie są wchłaniane w normalnych warunkach w ludzkim jelicie cienkim oraz dekstryny odporne powstające w wyniku fizycznej i chemicznej przemiany skrobi, będące krótkołańcuchowymi polimerami glukozy, ale wykazujące się większą opornością na hydrolizę enzymatyczną przez ludzkie enzymy trawienne. W końcowej części „Wstępu” Autor nakreślił skalę problemu związanego z otyłością we współczesnym świecie oraz powiązanie przybierania na wadze ze zmianami składu mikrobioty przewodu pokarmowego.



Do tej części pracy mam następujące uwagi:

- str. 5 – Według aktualnych badań liczba komórek bakteryjnych jest zbliżona do liczby komórek w organizmie człowieka (Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol 14(8): e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533).
- str. 5 – Zdanie „The second-largest system in the human body is the digestive system, with numbers ranging from 10^4 CFU/ml in the small intestine to 10^{14} CFU/ml in the large intestine” powinno raczej brzmieć “The second-largest system in the human body and at the same time the most dense microbial niche in our body is the digestive system, with numbers of bacteria ranging from 10^4 CFU/ml in the small intestine to 10^{14} CFU/ml in the large intestine”.
- rycina 5 – *Bifidobacterium* powinno być pisane kursywą.
- str. 16 – Fragment „comparing an individual whose diet is high in fiber and low in fat with an individual on the opposite diet (high in fiber and low fat)” powinien brzmieć: “comparing an individual whose diet is high in fiber and low in fat with an individual on the opposite diet (low in fiber and high fat)”.
- str. 22 – Zdanie „B vitamins, vitamin K, folic acid, and biotin can all be synthesized by the gut bacteria” powinno być poprawione. Kwas foliowy i biotyna to również witaminy z grupy B.
- str. 38 – W pierwszej części zdania “Additionally, Fibersol-2 was capable to restrict the development of a number of probiotic species while indirectly promoting the growth of numerous probiotic species” chodziło chyba o “pathogenic species”?
- str. 46 – Prawidłowa pisownia: *Fecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*.

W rozdziale 2 „Geneza, cel i hipotezy badawcze” oprócz jasno sformułowanych celów badań na uwagę zasługują dobrze postawione hipotezy badawcze (po trzy dotyczące badań *in vitro* i *in vivo*), które konsekwentnie są weryfikowane w wyniku realizowanych badań.

Do tej części rozprawy nie mam żadnych uwag.

Rozdział „Metody” opisany został bardzo szczegółowo, w sposób pozwalający na wykonanie analogicznych eksperymentów. Oprócz materiału biologicznego, podłoży i odczynników wykorzystanych w badaniach, opisano metody hodowli i analizy wzrostu poszczególnych grup drobnoustrojów; oznaczanie stężenia kwasu mlekowego, SCFA i BCFA metodą HPLC oraz spektrofotometryczne metody analizy aktywności wybranych enzymów bakteryjnych. Na szczególną uwagę zasługuje zaprezentowanie wielu informacji w formie czytelnych tabel oraz klarowne przedstawienie opisu metod wykorzystanych do analizy statystycznej.

Do tej części pracy mam tylko drobne uwagi:

- str. 50 – Wartości pH nie wyraża się w %.

- tabela 14 – Niejasne sformułowanie "of which" w komórkach tabeli dotyczących tłuszczów i węglowodanów.
- tabela 15 – W tytule tabeli należałoby napisać "Culture media and solutions..." ponieważ sól fizjologiczna (NaCl) nie jest podłożem mikrobiologicznym.
- tabela 15/str. 62 – Rozbieżność w nazwie podłoża: odpowiednio „Rogosa”/”MRS”.
- Zastanawia mnie jednak fakt wykorzystania pojedynczych izolatów z poszczególnych osób stanowiących źródło szczepów. Tylko w przypadku 4 gospodarzy do badań wytypowano więcej niż jeden izolat bakteryjny, w tym tylko dla jednego dziecka było to więcej niż 5 szczepów. Czy nie lepiej byłoby zamiast jednej bardzo dużej grupy szczepów stworzyć hodowlę mieszaną z reprezentatywnych dla poszczególnych grup taksonomicznych izolatów pozyskanych od jednego gospodarza, lub w miarę możliwości kilka takich odrębnych hodowli szczepów wyizolowanych od kilkorga dzieci? Czy taki uproszczony model nie byłby łatwiejszy do interpretacji i nie wykluczyłby zmienności wyników wynikającej z konkurencyjności i złożoności interakcji między szczepami? Prosiłabym, aby Doktorant ustosunkował się do powyższej kwestii podczas obrony pracy.

Prezentowane badania przedstawione w rozdziale 4 „Wyniki i dyskusja” podzielono na dwie części: *in vitro* i *in vivo*, które określają wpływ odpornej dekstryny ze skrobi ziemniaczanej na wzrost i wydzielane metabolity mikroflory jelitowej w płynie pohodowlanym (*in vitro*) oraz w próbkach kału dzieci z nadwagą lub otyłością (*in vivo*). Wyniki badań *in vitro* wykazały, że oporna dekstryna ze skrobi ziemniaczanej selektywnie zwiększa żywotność bakterii *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus*, w niewielkim stopniu wpływając na *Clostridium* i *Bacteroides*, o czym świadczy dodatnia wartość Indeksu Prebiotycznego. Ponadto, dodatek odpornej dekstryny powodował obniżenie pH hodowli wspólnej w czasie. Zastosowanie odpornej dekstryny ze skrobi ziemniaczanej spowodowało zwiększenie stężenia kwasu mlekowego i SCFA, przy jednoczesnym obniżeniu stężenia BCFA oraz pozytywnie wpływał na aktywność enzymów kałowych: powodując wzrost aktywności α -glukozydazy i α -galaktozydazy, a zmniejszając aktywność β -glukozydazy, β -galaktozydazy i β -glukuronidazy. Wyniki badań *in vivo* wykazały, że dodatek odpornej dekstryny do preparatów warzywno-owocowych powodował po 6 miesiącach ich spożywania wzrost stężenia badanych kwasów i miał również pozytywny wpływ na aktywność enzymów fekalnych. Stwierdzono również pozytywny wpływ dodatku odpornej dekstryny do preparatów na utrzymanie pozytywnych efektów 3 miesiące po zaprzestaniu ich spożywania. Najważniejsze wnioski z badań przedstawiono syntetycznie w rozdziale 5 „Podsumowanie i wnioski końcowe”.

Uwagi do tej części pracy:

- str. 84 – W podsumowaniu podrozdziału 4.1.2 napisano, że możliwe jest, że wielokierunkowe oddziaływania między mikroorganizmami są powodem znacząco wyższej liczby bakterii probiotycznych zidentyfikowanych w kokulturze. Czy nie warto byłoby sprawdzić jak jedne szczepy wpływają na inne, wykonać tzw. test na koegzystencję?



- str. 85 – We fragmencie „production of acidic metabolites (such as SCFA)” powinno się uwzględnić nie tylko SCFA, ale również kwas mlekowy. Podobnie w podsumowaniu podrozdziału 4.1.4 na str. 96.
- Podrozdział 4.1.5. – Na str. 97 przedstawiono α -glukozydazę i α -galaktozydazę jako enzymy o pozytywnym lub neutralnym wpływie na zdrowie człowieka, a β -glukozydazę, β -galaktozydazę i β -glukuronidazę o potencjalnie szkodliwym działaniu. W dyskusji na str. 103 przywołano pracę [van den Heuvel i wsp., 2005], wg której α - i β -glukozydaza są enzymami o korzystnym wpływie na zdrowie. Proszę o wyjaśnienie tej rozbieżności. Prosiłabym również Doktoranta o odniesienie się w tym kontekście do postulowanej probiotycznej właściwości niektórych szczepów posiadających aktywność β -galaktozydazy w zastosowaniu u ludzi z nietolerancją laktozy.
- str. 114 – Zdanie „In contrast, the Placebo group had a lower percentage of L-lactic acid and higher percentage of D-lactic acid” jest nieprawdziwe.
- str. 125 – Skrót dla „branched chain amino acids” jest BCAA, a nie BCFA.
- str. 128 – Prawdopodobnie powinno być „Thus, it can be concluded that tested resistant dextrin has comparable effects to known prebiotics such as inulin”.
- str. 136 – W rozdziale dotyczącym β -galaktozydazy prawdopodobnie zamieniono nazwę tego enzymu na β -glukozydazę. Powinno być: “there was a higher percentage of participants who experienced decrease in activity of β -galactosidase, which suggests a positive effect of resistant dextrin”.
- str. 145 – Błędny numer ryciny. Powinno być: „Figure 49”.
- Interpretacja części *in vivo* badań niewątpliwie nie była łatwa. Część wniosków odnośnie korzystnego wpływu odpornej dekstryny być może w niektórych miejscach pracy interpretowana jest nieco na wyrost gdyż jak sam Autor podkreśla samo regularne spożywanie preparatu warzywno-owocowego prawdopodobnie również przyczyniło się do wzrostu stężeń SCFA (i spadku BCFA) oraz wzrostu aktywności enzymów kałowych. Trzeba podkreślić jednak fakt, iż Doktorant przeanalizował wyniki również na poziomie indywidualnym (każdego uczestnika badań osobno) co pozwoliło na zaobserwowanie pewnych pozytywnych tendencji oraz podkreślił istotność prowadzenia dalszych badań w celu określenia znaczenia klinicznego i zbadania potencjalnych korzyści zdrowotnych wynikających z zaobserwowanych korzystnych efektów.

Uwagi ogólne do pracy:

- W pracy stosowane jest stare nazewnictwo w odniesieniu do typów bakterii *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Acinetobacter* (błędnie podana nazwa, Autorowi chodziło prawdopodobnie o *Actinobacteria*). Powinno się podać (przynajmniej raz w tekście pracy) obowiązujące od 2021 r. nowe nazwy taksonomiczne, odpowiednio: *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, które można sprawdzić na stronie: <https://lpsn.dsmz.de>.

- Błędne użycie nazwy „*Lactobacillus*”. Zgodnie z wytycznymi przedstawionymi w pracy Zheng i wsp. 2020 (10.1099/ijsem.0.004107) bakterie należące do dawnego gatunku *Lactobacillus* (przed 2020 r.) powinny być określane jako „lactobacilli”. Wg aktualnie obowiązującej klasyfikacji rodzaj *Lactobacillus* odnosi się do ściśle określonych gatunków przystosowanych do życia w organizmie gospodarza.
- Brak konsekwencji w prezentowaniu nazw gatunków i skrótów.
- Brak listy skrótów, która ułatwiłaby lekturę pracy, jednocześnie wielokrotne powtarzanie znaczenia niektórych skrótów.
- Wielokrotnie nieprawidłowa pisowni bez spacji pomiędzy wartościami a jednostkami miar.
- Drobne błędy edytorskie, np. brak jednolitości w pisowni liczb: „1000”/”1,000”, „what” zamiast „wheat”, *in vitro* napisane nie kursywą.

Pragnę podkreślić, że wskazane przeze mnie uwagi nie wpływają na moją pozytywną ocenę pracy Doktoranta ze względu na wysoki poziom naukowy i rangę wyników, których część może w przyszłości posłużyć do lepszego zrozumienia wpływu mikrobioty na otyłość (w szczególności korelacji pomiędzy stężeniem metabolitów bakteryjnych a masą ciała dzieci) oraz do opracowania zapobiegającej nadwadze żywności funkcjonalnej opartej o innowacyjne produkty prebiotyczne.

Wartym podkreślenia jest również całościowy dorobek naukowy Doktoranta, który obejmuje 4 publikacje naukowe i 8 doniesień konferencyjnych, w tym 1 poster zatytułowany „Wpływ odpornej dekstryny na wybrane markery oddziaływania zdrowotnego w badaniach *in vitro*”, który uzyskał w 2023 r. nagrodę za najlepszy poster naukowy na VI Sesji Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji praca mgr. inż. Michała Włodarczyka pt. „Study on effects of resistant dextrin on selected health markers *in vitro* and *in vivo*” spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z p6:zn. zm.). Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wskazuje na znaczącą wiedzę teoretyczną Doktoranta oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia prac eksperymentalnych *in vitro* i *in vivo*. Zwracam się zatem do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. inż. Michała Włodarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Signed by /
Podpisano przez:

Magdalena Ewa
Kowalczyk
Instytut Biochemii
i Biofizyki PAN

Date / Data: 2023-
08-24 13:27

