



## WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOSCI I ŻYWIENIU

### Katedra Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej

prof. dr hab. Joanna Kobus-Cisowska

Poznań, 22 lipca 2024 r.

#### Recenzja rozprawy doktorskiej

**Autor: mgr inż. Ewelina Grygiel**

**Tytuł: Wpływ warunków wzrostu i przechowywania na zawartość związków biologicznie czynnych oraz aktywność przeciwutleniającą kielków koniczyny (*Trifolium L.*)**

Rozprawa doktorska wykonana na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej.

Promotorzy:

**prof. dr hab. Grażyna Budryn**

**dr inż. Ilona Gałązka-Czarnecka**

**Recenzję wykonano na podstawie pisma pani Dziekan dr hab. Anny Diowksz prof. PŁ z dnia 05.07.2024 r.**

#### 1. Dobór i znaczenie tematu

Kielki roślin mają istotne znaczenie w technologii żywności ze względu na swoje wyjątkowe właściwości odżywcze i prozdrowotne. Są one wartościowym dodatkiem do diety i mają potencjał do znaczącego wpływu na zdrowie. Badania dotyczące wpływu warunków wzrostu i przechowywania na zawartość związków biologicznie czynnych oraz aktywność przeciwutleniającą kielków koniczyny (*Trifolium L.*) mają duże znaczenie zarówno dla nauki, jak i dla praktyki rolniczej, przemysłu spożywczego oraz zdrowia publicznego. Badania takie są niezbędne w celu identyfikacji związków biologicznie aktywnych (np. witaminy, polifenole, flawonoidy), które są obecne w kielkach koniczyny, ponieważ mogą wykazywać właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i inne prozdrowotne. Ocena, jak różne warunki wzrostu (np. naświetlenie, temperatura, wilgotność, rodzaj podłoża) wpływają na zawartość związków bioaktywnych, pozwala na optymalizację tych warunków w celu uzyskania kielków o najwyższej wartości odżywczej i i wydajności. Zatem stwierdzam, że problematyka podjęta w pracy ma duże znaczenie zarówno w zakresie rolnictwa jak i przemysłu.

Związki przeciwutleniające odgrywają kluczową rolę w ochronie organizmu przed stresem oksydacyjnym i chorobami przewlekłymi, takimi jak choroby serca, nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne. Zrozumienie, jak warunki wzrostu i przechowywania wpływają na te związki, może przyczynić się do opracowania lepszych strategii prewencyjnych i dietetycznych. Podobnie



badania wpływu metod przechowywania na stabilność związków biologicznie czynnych i aktywność przeciwutleniającą, jest kluczowe dla przedłużenia trwałości kielków i zachowania ich wartości odżywczej. Może to prowadzić do opracowania lepszych metod pakowania i przechowywania produktów spożywczych, co ma olbrzymie znaczenie gospodarcze i środowiskowe związane z marnotrawieniem żywności. Badania podjęte w pracy mogą zatem dostarczyć rolnikom i producentom żywności informacji, jak uprawiać i przechowywać kielki koniczyny, aby osiągnąć najlepszą jakość produktów, co może wpływać na konkurencyjność na rynku oraz satysfakcję konsumentów. Takie badania dostarczają danych, które mogą być podstawą dla dalszych badań w dziedzinie agronomii, biotechnologii, żywienia jak również medycyny. Informacje na temat najlepszych metod przechowywania mogą pomóc w dostarczaniu konsumentom produktów o najwyższej jakości. Ponadto wyniki badań mogą mieć znaczenie dla przeciętnego konsumenta - mogą być używane do edukowania na temat korzyści zdrowotnych spożywania kielków koniczyny oraz na co zwracać uwagę podczas zakupu i przechowywania tych produktów. Edukacja na temat korzyści zdrowotnych spożywania kielków koniczyny może zachęcić do ich większego spożycia.

W tej tematyce badawczej mieści się przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Eweliny Grygieł, której najważniejszym celem była ocena wpływu warunków wzrostu i przechowywania na zawartość związków biologicznie czynnych oraz aktywność przeciwutleniającą kielków koniczyny (*Trifolium L.*), a tematykę podjętą w pracy uważam za zasadną o dużym potencjale naukowym, przemysłowym i poznawczym.

## 2. Ocena formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji praca doktorska jest bardzo obszerna i składa się z 210 stronicowego opracowania. W pracy zawarto niezbędne rozdziały takie jak: wstęp, cel i zakres pracy, metodyka badań, wyniki badań i dyskusja, wnioski, streszczenie (w języku polskim i angielskim), spis tabel, spis rysunków, bibliografia.

Rozdział zatytułowany wstęp poprzedzony jest dwustronicowym wprowadzeniem. Część literaturowa (opisana jako wstęp) składa się z 10 podrozdziałów opisanych na 59 stronach maszynopisu. W pierwszych 5 częściach Doktorantka przedstawiła aspekty związane z uprawą kielków koniczyny. W kolejnych częściach opisała aktualny stan wiedzy w zakresie zawartości związków aktywnych kielków koniczyny, a w dwóch ostatnich przedstawiła kwerendę literatury na temat wpływu przechowywania na ich jakość.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła cel pracy i zakres badań. W tej właśnie części przedstawiła hipotezy badawcze i wskazała 7 obszarów badawczych, które zostały podjęte w pracy.



**UWAGA 1.** W pracy zabrakło mi graficznego przedstawienia modelu doświadczenia. Wizualizacja modelu ułatwiłaby odbiór przekazu danych na temat wyników poszczególnych eksperymentów.

Kolejna część to metodyka badań. Opis metodyki jest bardzo szczegółowy i umożliwia odtworzenie poszczególnych eksperymentów.

**PYTANIE 1.** W pracy zabrakło opisu parametrów procesu liofilizacji (strona 69). Doktorantka wskazała, że próby zamrażała w temperaturze  $-46^{\circ}\text{C}$ . Tutaj proszę o doprecyzowanie parametrów suszenia. Proszę też o wyjaśnienie czy materiał przed suszeniem przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze  $-18^{\circ}$  czy przechowywano zamrożony liofilizat, ponieważ zapisy w tym zakresie nie są jednoznaczne.

Kolejny rozdział to wyniki i dyskusja, a każdy z 6 podrozdziałów wynikowych został podsumowany. Kolejny rozdział to wnioski, który zawiera 11 wniosków, nawiązujących do postawionych celów i hipotez. Kolejna część to spis literatury, który obejmuje ponad 360 pozycji, a zatem jest bardzo obszerny i stanowi dojrzałą kwerendę dostępnej literatury w zakresie przedmiotu pracy. Większość cytowanych prac pochodzi ze znaczących czasopism naukowych, które zostały opublikowane w ostatnich 10 latach.

Podsumowując ocenę formalną pracy, stwierdzam, że uszeregowanie rozdziałów oraz forma prezentacji wyników są logiczne i klarowne. Doktorantka starannie wyselekcjonowała materiał faktograficzny, co sprawia, że praca jest przejrzysta i zrozumiała. Świadczy to o dużym zaangażowaniu i wysokim poziomie profesjonalizmu Doktorantki.

### **3. Ocena metodyczna i merytoryczna rozprawy**

Rozprawa została przygotowana na wysokim poziomie zarówno pod względem metodycznym, jak i merytorycznym. Doktorantka wykazała się doskonałą znajomością tematu, a także umiejętnością dogłębnej analizy i syntetyzowania informacji. Wykonała szeroką i wszechstronną analizę literatury, którą przedstawiła we wstępie w sposób przemyślany i klarowny. Ta część pracy wyróżnia się wysoką jakością merytoryczną, świadczącą o dogłębnym zrozumieniu tematu. Uważam, że może ona stanowić doskonały materiał do publikacji w wysokopunktowym czasopiśmie naukowym.

Materiał badany został odpowiednio opisany. Stanowiły go nasiona dostępne w specjalistycznych placówkach handlowych i uzyskane z nich kielki pięciu odmian koniczyny: koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L.) Rozeta i Nike, koniczyny białej (*Trifolium repens* L.), koniczyny egipskiej (*Trifolium alexandrinum* L.) i koniczyny bladuróżowej (*Trifolium hybridum* L.). Głównym celem pracy



było porównanie składu ilościowego i jakościowego izoflawonów, związków polifenolowych oraz kwasu L-askorbinowego w wybranych odmianach kielków koniczyny (*Trifolium L.*) oraz określenie aktywności przeciwutleniającej podczas wzrostu i kiełkowania w zróżnicowanych warunkach.

Metodyka badawcza została starannie dobrana i odpowiednio uzasadniona. Zastosowane metody badawcze są adekwatne do celów rozprawy i pozwalają na uzyskanie rzetelnych wyników. Doktorantka wykorzystwała w badaniach nowoczesne techniki analityczne i uznane w środowisku naukowym metody. Ponadto skrupulatnie przedstawiła proces badawczy, co świadczy o jej solidnym przygotowaniu naukowym.

W pracy przedstawiono poddano weryfikacji 4 hipotezy tj.:

- wydajność ekstrakcji związków polifenolowych oraz izoflawonów z kielków koniczyny zależy od zastosowanego rozpuszczalnika oraz jego stężenia
- dostęp do rozproszonego światła dziennego oraz jego brak wpływa na syntezę wybranych izoflawonów oraz witamin, a także na aktywność przeciwutleniającą podczas kiełkowania nasion koniczyny;
- skład ilościowy i jakościowy izoflawonów zmienia się w czasie kiełkowania oraz zależy od odmiany nasion i kielków koniczyny;
- przechowywanie kielków koniczyny czerwonej w zróżnicowanych warunkach wpływa na stabilność wybranych izoflawonów, witamin, chlorofili, karotenoidów, aktywność przeciwutleniającą oraz ich cechy sensoryczne.

**UWAGA 2.** Weryfikacja hipotez badawczych jest kluczowym elementem procesu badawczego. Proces ten obejmuje kilka etapów, które pomagają określić, czy hipoteza jest prawdziwa, czy fałszywa. Na podstawie wyników testów statystycznych należy zdecydować o odrzuceniu hipotezy zerowej. Jeśli wyniki są statystycznie istotne, hipoteza zerowa jest wówczas odrzucana na korzyść hipotezy alternatywnej. Dlatego Doktorantka w wyniku swoich badań powinna ustosunkować się literalnie do wszystkich założonych w pracy hipotez po poszczególnych etapach pracy lub na końcu w części podsumowanie.

W pierwszym etapie Doktorantka określiła wydajność ekstrakcji związków polifenolowych oraz izoflawonów w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika i jego stężenia z wykorzystaniem ekstraktora ciśnieniowego.

**PYTANIE 2.** Proszę uzasadnić, dlaczego w tym etapie badania realizowano dla 2 odmian koniczyny (koniczyna czerwona *Nike* i koniczyna egipska *Alex*), a nie wszystkich odmian analizowanych w pracy.



Drugi etap badań obejmował analizy podczas uprawy i wzrostu kiełków koniczyny w warunkach z dostępem do rozproszonego światła dziennego i w ciemności. Uprawę prowadzono w zautomatyzowanych kiełkownicach Mikrofarm EasyGreen. W ekstraktach z nasion i kiełków oznaczono zawartość polifenoli ogółem metodą Folina-Ciocalteu'a, zawartość kwasu L-askorbinowego metodą Tillmansa, zdolność zmiatania wolnych rodników DPPH, a także skład ilościowy i jakościowy izoflawonów oraz kumestrolu. Porównano także skład podstawowy kiełków poszczególnych odmian w tym zawartość wody, białka i tłuszczu. Dokonano oceny wpływu przechowywania chłodniczego, w tym w modyfikowanej atmosferze, na zawartość i stabilność wybranych związków biologicznie czynnych oraz na aktywność przeciwutleniającą kiełków koniczyny różnych odmian. Jednocześnie wykonano analizę cech sensorycznych kiełków podczas przechowywania.

**PYTANIE 3.** Czy Doktorantka badała/ zwracała uwagę na jakość mikrobiologiczną uzyskanych kiełków w trakcie procesu produkcji oraz w trakcie przechowywania? Wiadomym jest, że warunki pakowania wpływają na aspekt jakości mikrobiologicznej tego typu produktów. Zrozumiałe dla mnie jest, że cel pracy nawiązywał do wartości odżywczej i właściwości, ale czy Doktorantka może wypowiedzieć się na ten temat na podstawie swoich obserwacji i/lub danych literaturowych.

**PYTANIE 4.** Jak można wytłumaczyć kilkukrotnie wyższą zawartość flawonoidów w nasionach koniczyny czerwonej w porównaniu ich zawartości w kiełkach oznaczoną przez innych badaczy (przedstawioną w części literaturowej w Tabeli 7, str 41) vs zawartość polifenoli w pracy (Tabela 18, str 89), gdzie zawartość związków polifenolowych jest kilkukrotnie wyższa w kiełkach niż w nasionach.

Pod względem merytorycznym rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój dyscypliny technologia żywności i żywienia. Uzyskane w trakcie eksperymentów wyniki potwierdziły, że warunki wzrostu, a w szczególności dostęp do światła dziennego wpływa na syntezę izoflawonów, związków polifenolowych, kwasu L-askorbinowego oraz aktywność przeciwutleniającą kiełków koniczyny. Ponadto Doktorantka wykazała, że zawartość w/w składników i zdolność przeciwutleniająca kiełków są istotnie determinowane przez odmianę kiełków oraz długość okresu kiełkowania.

W mojej ocenie duże znaczenie mają wyniki badań, w których Doktorantka wykazała, że zawartość zarówno izoflawonów jak i kumestrolu w nasionach jak i kiełkach koniczyny zależała od odmiany. Najwyższym stężeniem analizowanych izoflawonów ogółem charakteryzowały się kiełki i nasiona koniczyny czerwonej odmiany Rozeta, zaś najniższe ilości tych związków określono w kiełkach i nasionach koniczyny białej. Nasiona koniczyny białej zawierały największe ilości genistyny, a nasiona koniczyny białoróżowej obfitowały w genisteinę i formononetynę. Efekty przeprowadzonych analiz dowiodły, że zarówno profil jakościowy izoflawonów jak i dynamika ilościowa akumulacji tych





związków w kielkach koniczyny uzależnione były od warunków prowadzenia uprawy, a także zmieniały się znacząco w czasie kiełkowania. Co ważne, Doktorantka wskazała, że nie można ustalić jednego wspólnego dnia, który mógłby być najkorzystniejszym dniem zbioru kielków koniczyny pod względem najwyższego stężenia wszystkich badanych izoflawonów. Maksymalna zawartość poszczególnych substancji występuje w innych dniach, w zależności od odmiany, gatunku i warunków prowadzenia uprawy oraz jest cechą indywidualną każdego związku.

**PYTANIE 5.** Czy w związku z powyższym można dokonać ogólnego zalecenia dla producentów kielków koniczyny odnośnie technologii uprawy tak, aby wskazać warunki najbardziej korzystne z punktu widzenia ekonomiki procesu i wartości odżywczej?

W mojej opinii najwyższą wartość naukową posiada ostatni etap badań, który obejmował analizy jakości i właściwości kielków koniczyny czerwonej z nasion odmiany Rozeta przechowywanych w warunkach chłodniczych w folii LDPE oraz pakowanych w zmodyfikowanym składzie atmosfery. Doktorantka wskazała, że niska temperatura nie powoduje degradacji polifenoli, a dla zachowania względnie wysokiego poziomu związków polifenolowych najlepiej nie przekraczać 10 dni przechowywania w warunkach chłodniczych oraz zastosować MAP o zmniejszonej zawartości tlenu - 5% i zwiększonej zawartości dwutlenku węgla (również 5%), które w czasie przechowywania kielków koniczyny czerwonej jest korzystniejszym stężeniem dla zachowania właściwości antyoksydacyjnych aniżeli jego zwiększenie do 10%. Najlepszym wariantem przechowywania kielków koniczyny dla spowolnienia degradacji kwasu L-askorbinowego było połączenie niskiej temperatury wraz z MAP o składzie 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>. Natomiast wzrost zawartości CO<sub>2</sub> do 10% nie powodował już lepszej stabilizacji tego składnika.

**PYTANIE 6.** Doktorantka wykazała wysoki potencjał przeciwutleniający kielków koniczyny. Proszę o informację, jaka ilość spożytych kielków w ciągu dnia mogłaby mieć znaczenie dietetyczne. Czy można właściwości kielków koniczyny porównać do innych znanych surowców stosowanych w diecie o znaczeniu przeciwutleniającym?

**PYTANIE 7.** Doktorantka wykazała, że przechowywanie kielków koniczyny czerwonej w zastosowanych warunkach MAP wpływa na ich wzrost bioaktywności. Zawartość izoflawonów wzrosła kilkukrotnie w czasie 14 dni przechowywania. Jak można wytłumaczyć wzrost zawartości izoflawonów w czasie przechowywania? Czy literatura przedmiotu wskazuje na takie tendencje również w przypadku innych składników / innych kielków? Czy zawartość tych składników jest tożsama z bioaktywnością? Na jakiej podstawie Doktorantka wnioskuje o wzroście bioaktywności?



Dokonana ocena sensoryczna kiełków pokazała, że kiełki przechowywane w MAP 2 wyróżniały się korzystniejszymi cechami sensorycznymi, w porównaniu do tych przechowywanych jedynie w warunkach chłodniczych (K) oraz w MAP 1. Stwierdzono, że przechowywanie kiełków koniczyny czerwonej w modyfikowanej atmosferze o składzie 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, gdzie zastosowano obniżenie zawartości tlenu z jednoczesnym zwiększeniem stężenia dwutlenku węgla, wpływa pozytywnie na ich walory sensoryczne w czasie od 7 do 9 dni przechowywania.

Uważam, że ten fragment pracy zawiera interesujące wnioski, które mogą być inspiracją do dalszych badań, np. dotyczących wpływu warunków przechowywania na jakość mikrobiologiczną.

Przedstawione wyniki badań potwierdziły wpływ światła dziennego na syntezę izoflawonów oraz witamin, a także na aktywność przeciwutleniającą podczas kiełkowania nasion koniczyny. Późniejsze przechowywanie kiełków koniczyny czerwonej w zróżnicowanych warunkach w różny sposób wpływały na stabilność wybranych izoflawonów, witamin, chlorofili, karotenoidów, aktywność przeciwutleniającą oraz ich cechy sensoryczne. Tu Doktorantka podkreśliła, że warto analizować różne warunki wzrostu kiełków oraz ich przechowywania w celu zapewnienia możliwie najwyższych poziomów związków bioaktywnych, z czym całkowicie się zgadzam.

**UWAGA 3.** W tabelach w pracy niekonsekwentnie opisano istotność różnic. Przykładem może być Tabela 40 kolumna prezentująca zawartość białka. W podpisie wskazano, że literami oznaczono istotność różnic w ramach kolumny, a nie pomiędzy kolumnami. Zatem kiełki powinny być oznaczone literą „a” a nie „c” – tak jak ma to miejsce np. w tabeli 39 str. 156. To samo dotyczy pozostałych tabel – widzę wiele niekonsekwentnych oznaczeń w zakresie istotności różnic w prezentowanych wynikach.

**UWAGA 3.** Nazwy łacińskie powinny być zapisane czcionką *italic*. Uwaga dotyczy spisu literatury na wszystkich stronach spisu.

**UWAGA 4.** W spisie tabel na stronie 170 nie ma potrzeby, aby podawać źródło przedstawianych informacji – tabele od 1 do 47.

Podsumowując ocenę merytoryczną stwierdzam, że Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową w swojej pracy. Jej wnioski, oparte na rzetelnej analizie wyników, mają istotne znaczenie nie tylko w kontekście naukowym, ale również technologicznym i dietetycznym. Wskazówki i sugestie zawarte w recenzji, mimo że są cenne, mają charakter porządkowy, wyjaśniający lub dyskusyjny i nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną pracy.



#### 4. Wniosek końcowy

Przedłożoną do recenzji pracę doktorską oceniam pozytywnie. Tematyka pracy doktorskiej stanowi istotne *novum* w dyscyplinie technologii żywności i żywienia, wnosząc świeże spojrzenie na aktualne trendy badań nad właściwościami funkcjonalnymi żywności. Badania zostały starannie zaplanowane oraz przeprowadzone przy użyciu precyzyjnie dobranej metodologii i zaawansowanej aparatury. Wyniki pracy przyczyniają się do pogłębienia wiedzy w tej dziedzinie i stanowią cenny wkład w rozwój nowoczesnych rozwiązań technologicznych oraz dietetycznych.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Grygiel pn. **„Wpływ warunków wzrostu i przechowywania na zawartość związków biologicznie czynnych oraz aktywność przeciwutleniającą kielków koniczyny (*Trifolium L.*)** spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595 z póź. zm.), Rozporządzeniem 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 oraz Ustawą z dnia 3 lipca 2018 (Dz. U. 2018 poz. 261) oraz Przepisami wprowadzającymi ustawę – Prawo o szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z póź. zm.).

**Dlatego składam wniosek do Rady Dyscypliny Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Eweliny Grygiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego prowadzonego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.**

prof. dr hab. Joanna Kobus-Clisowska