

Lublin, 06.08.2024 r.

prof. dr hab. Michał Świeca
Katedra Biochemii i Chemii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Ewelina Grygiel „Wpływ warunków wzrostu i przechowywania na zawartość związków biologicznie czynnych oraz aktywność przeciwutleniającą kiełków koniczyny (*Trifolium L.*)” wykonanej pod kierunkiem Promotor prof. dr hab. inż. Grażyny Budryn oraz Promotor pomocniczej dr inż. Ilony Gałązki-Czarneckiej.

Podstawa prawna: Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. 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., Ustawą z dnia 3 lipca 2018 (Dz.U. 2018 poz. 261) oraz Przepisami wprowadzającymi ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018 poz. 1669 z póź. zm.).

Podstawą opinii jest pismo dr hab. inż. Anny Dwioksz prof. uczelni Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej z dnia 02-07-2023.

Uzasadnienie podjęcia badań w temacie oraz ocena formalna pracy

Żywność niskoprzetworzona, w tym żywność skiełkowana, w ostatnich latach zdobywa coraz szerszą popularność, co wynika z jej unikalnej wartości odżywczej i właściwości prozdrowotnych. Pomimo pozornej łatwości uzyskiwania tego typu produktów, w przypadku przemysłowej ich produkcji i dystrybucji należy poddać walidacji kluczowe elementy procesu technologicznego. Pozwala to też, co wykazano w tej dysertacji, na kierunkowe kształtowanie jakości finalnego produktu, kreowanej nie tylko poprzez wybór optymalnych warunków kiełkowania (m.in. czasu, temperatury, oświetlenia), ale także poprzez czynniki genetyczne (dobór gatunku i odmiany). Pani mgr inż. Ewelina Grygiel w opracowaniu dokonuje

wnikliwej oceny warunków otrzymywania i przechowywania kiełków koniczyny kładąc szczególny nacisk na dynamikę zmian obserwowanych we frakcji przeciwutleniaczy niskocząsteczkowych, w tym polifenoli. Konfrontacja uzyskanych wyników z danymi literaturowymi wskazuje również na potrzebę walidacji i ujednoczenia podejść metodologicznych stosowanych do oceny składu i jakości żywności. W świetle tych stwierdzeń podjęta tematyka jest aktualna, a wyniki projektu doktorskiego wnoszą istotny wkład w rozwój dyscypliny.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie opracowania monograficznego o strukturze typowej dla tego typu opracowań. Dysertacja rozpoczyna się spisem treści, który z pewnością ułatwia nawigację po obszernej 210 stronicowej pracy. W rozdziale Wstęp Doktorantka ukazuje tło badań, podsumowując dotychczasową wiedzę w temacie. Hipotezy badawcze oraz cele badań zostały jasno opisane. Z kolei rozdział Metodyka badań w sposób szczegółowy, powalający na odtworzenie eksperymentów, charakteryzuje materiał doświadczalny, zabiegi technologiczne oraz procedury analityczne i statystyczne. W kolejnym rozdziale obejmującym 74 strony maszynopisu (Wyniki oraz Dyskusja) Doktorantka przedstawia wyniki badań (14 wykresy i 27 tabel), dokonuje ich oceny oraz konfrontuje je z danymi literaturowymi. Całość projektu doktorskiego została podsumowana w formie 11 wniosków. Zgodnie z wymogami Ustawy (Art. 187) streszczenia w języku polskim (str. 162) oraz angielskim (str. 166) w syntetyczny sposób wprowadzają w problematykę badawczą oraz podsumowują najważniejsze osiągnięcia projektu doktorskiego. Finalnie dysertację kończą rozdziały Spis Tabel, Spis Rysunków oraz Bibliografia (ponad 300 pozycji). Generalnie, dysertacja została napisana w sposób przemyślany, drobne błędy interpunkcyjne i edytorskie nie wpływają na wartość merytoryczną opracowania.

Ocena merytoryczna pracy wraz z odniesieniem się do wymagań Ustawy stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora

Celem pracy doktorskiej było określenie kinetyki zmian składu i aktywności przeciwutleniającej w kiełkach różnych gatunków koniczyny (*Trifolium* L.) w odniesieniu do zmiennych warunków kiełkowania. Cel aplikacyjny obejmował określenie optymalnych warunków wzrostu (oświetlenie, czas) oraz możliwości zachowania wysokiej jakości

produktu podczas przechowywania chłodniczego. Doktorantka w pierwszych częściach dysertacji dokonuje szczegółowej charakterystyki botanicznej i etnofarmakologicznej roślin z rodzaju *Trifolium*, fizjologii procesu kiełkowania oraz roli żywności skiełkowanej w nowoczesnej technologii żywności i żywieniu człowieka (w mojej ocenie tę część można byłoby rozbudować kosztem wcześniejszych informacji). W części tej na podkreślenie zasługuje szczegółowa analiza wpływu wybranych czynników na skład i jakość kiełków różnych gatunków roślin. Finalnie ostatnie podrozdziały podsumowują dotychczasową wiedzę z zakresu wpływu modyfikacji procesu kiełkowania i późniejszego przechowywania na skład frakcji bioaktywnych. Aplikantka skupia się w nich na metabolomie kiełków koniczyny, w mniejszym stopniu oceniając wpływ na wartość odżywczą oraz bezpieczeństwo konsumentów (np. jakość mikrobiologiczna kiełków). Podrozdziały te potwierdzają, że pomimo kilku badań dotyczących kiełkowania koniczyn wiedza w tym zakresie jest niespójna (np. dane prezentowane w Tabeli 6, str. 40), a w wielu aspektach również fragmentaryczna. W świetle tych faktów, opracowanie to jest niezwykle ważne, systematyzujące dotychczasowe doniesienia naukowe i może zostać w przyszłości użyte do opracowania publikacji przeglądowej. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na drobne niedociągnięcia i niespójności, które mogą wpływać na całościowy odbiór tej części pracy np. (1) opis kiełkowania (str. 22) podany za Gan i współpracownicy (m.in. zaleca wymianę wody w celu usunięcia metabolitów i endogennej mikrobioty?), który nijak się ma do procesu prowadzonego automatycznie, (2) niespójności w Tabeli 2 i jej opisie (wartość kaloryczna kcal/g vs. kcal/100g), (3) brak kolumny w Tabeli 4 oraz legendy. Pewne wątpliwości budzą również stwierdzenia dotyczące generowania stresu w kiełkach poprzez aplikację substancji takich jak aminokwasy, gdzie efekt finalny nie jest związany z indukcją naturalnych mechanizmów obronnych a raczej wynika z suplementacji szlaków syntezy (ang. *precursor feeding*) (str. 22).

Reasumując, już na tym etapie (pomimo, że zagadnienia te są jeszcze poruszane w rozdziale Wyniki i Dyskusja) mogę stwierdzić, że Doktorantka wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej technologii żywności i żywienia, a tym samym spełnia jedno z wymagań Ustawy stawianych kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Kolejna część dysertacji stanowi rozdział Metodyka badań, w której przedstawiono materiał badawczy oraz metodologię badań. Jak już wspomniałem we wcześniejszej części recenzji opisy są wyczerpujące, jasne i pozwalają na powtórzenie prowadzonych doświadczeń. Na podkreślenie zasługuje technologia kiełkowania nasion, gdzie zastosowano automatyczny zestaw EasyGreen Microfarm pozwalający na prowadzenie doświadczeń w warunkach zbliżonych do przemysłowych. Z kolei, biorąc pod uwagę wpływ oświetlenia na skład kiełków pewne wątpliwości budzi brak jednoznacznego określenia natężenia światła („z dostępem rozproszonego promieniowania słonecznego...”). Pragnę podkreślić, że zastosowana metodologia jest poprawna, przemyślana i w pełni adekwatna do badań mających dostarczyć wiedzy niezbędnej do osiągnięcia zamierzonych celów. Doktorantka zastosowała zaawansowane techniki analityczne w procesie otrzymywania ekstraktów (walidacja procesu) oraz ich późniejszej charakterystyki ilościowo-jakościowej. Z opisu wynika, że metodologia zastosowana przez Doktorantkę do określenia profilu jakościowego i ilościowego wybranych związków biologicznie aktywnych w badanych kiełkach koniczyny została przynajmniej w części przez nią opracowana. Wskazuje to na jej świadomość, że aby prawidłowo ocenić skład niezbędne jest efektywne wyizolowanie badanych związków. W tym miejscu chciałbym zapytać Doktorantkę, czy nie brała pod uwagę możliwości zastosowania izolacji sekwencyjnej, która pozwalałaby na wyizolowanie różnych klas związków o odmiennej polarności, a tym samym pełnej ocenie składu i aktywności z uwzględnieniem interakcji składników aktywnych.

Cześć doświadczalna projektu doktorskiego jest przemyślana i w pierwszej kolejności obejmuje określenie zawartości polifenoli oraz aktywności antyoksydacyjnej w kiełkach wybranych gatunków koniczyny. Doktorantka zwraca tu uwagę na aspekt niejednokrotnie pomijany w badaniach żywności tj. dobór optymalnego układu ekstrakcyjnego – w mojej ocenie walidacja procesu istotnie poszerza dotychczasową wiedzę w tym zakresie. Niewątpliwym osiągnięciem badań jest także określenie wpływu warunków uprawy kiełków na skład jakościowy i ilościowy wybranych związków biologicznie aktywnych, w tym izoflawonów, kumestrolu oraz kwasu L-askorbinowego - kiełki rosące z dostępem do rozproszonego światła dziennego są bogatsze w analizowane związki, co przekłada się na wzrost potencjału antyrodnikowego. Badania mają duży ładunek aplikacyjności i pozwalają na wyznaczenie optymalnego czasu zbioru zapewniającego nie tylko wysoką zawartość związków aktywnych biologicznie, ale także pożądaną wartość odżywczą i cechy

organoleptyczne. Należy tu również podkreślić istotny wpływ gatunku i odmiany koniczyny na badane parametry otrzymanych kielków. Maksymalna zawartość poszczególnych substancji w zależności od gatunku i sposobu uprawy występuje w innych dniach oraz jest cechą indywidualną każdego związku. Finalnie, Pani Grygiel ocenia wpływ przechowywania chłodniczego, w tym także w modyfikowanej atmosferze, na zmiany zawartości wybranych związków biologicznie aktywnych, aktywności antyoksydacyjnej i ocenę konsumencką kielków koniczyny czerwonej. Niska temperatura nie powoduje degradacji polifenoli, a zastosowanie MAP (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) pozwala na zachowanie ich wysokiego poziomu podczas 10 dniowego przechowywania. Co istotne, Doktorantka nie unika krytycznej dyskusji uzyskanych wyników konfrontując je z danymi literaturowymi, podejmując próbę wytłumaczenia pewnych zjawisk i obserwacji. Robi to na tyle wnikliwie, że w wielu miejscach dysertacji, gdzie jako recenzent dostrzegłem interesujące wyniki tzn. odbiegające od tych przewidywanych (np. słabsza ekstrakcja izoflawonów przy wyższym rozdrobieniu próbek) natychmiast znajdowałem szczegółową ich analizę wraz z propozycją wyjaśnienia potencjalnych mechanizmów i czynników mogących mieć wpływ na zaobserwowane zależności. Odnosząc się do części opisującej wyniki i dyskusję pragnę zwrócić uwagę na kilka zagadnień:

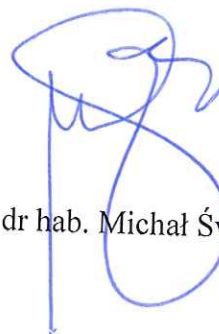
- W swoich badaniach Doktorantka skupiła się na analizach składu dokonując w ograniczonym zakresie analiz potencjalnej bioaktywności. Jak wykazała aktywność antyoksydacyjna/przeciwrodnikowa jest kreowana nie tylko poprzez frakcję polifenolową, ale również inne składniki kielków (Tabela 18 vs. 19). Prosiłbym o komentarz do zaobserwowanego zjawiska. Chciałbym również prosić Doktorantkę o zaproponowanie modelu badawczego, który mógłby w szerszym zakresie scharakteryzować potencjalne właściwości biologiczne, w tym mimikrę molekularną estrogenów.
- W jaki sposób można wytłumaczyć kinetykę zmian w ogólnej zawartości polifenoli podczas przechowywania i zdolności do neutralizacji rodnika DPPH (rys. 30-31) tj. ich istotny wzrost w stosunku do kielków kontrolnych (szczególnie MAP2)? Jak te zmiany ilościowe mają się do analizy ilościowo -jakościowej (tabela 36), gdzie najwyższą zawartość polifenoli oznaczono w wariancie przechowywania MAP1?

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że Pani Grygiel posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, w tym projektowania eksperymentów, opracowywania wyników oraz ich krytycznej oceny. Doktorantka wykazała, że wyniki

dotychczasowych badań z zakresu analiz składu mogą być niedoszacowane z uwagi na brak optymalizacji procesu ekstrakcji. W projekcie doktorskim połączyła Ona umiejętnie zagadnienia z zakresu technologii żywności, chemii analitycznej i towaroznawstwa, a przedstawiona do oceny dysertacja zawiera wyniki wartościowe pod względem poznawczym i aplikacyjnym. W tym miejscu raz jeszcze podkreślam kompleksowe analizy kinetyki zmian wybranych parametrów podczas kiełkowania i późniejszego przechowania otrzymanych preparatów. Pani Grygiel osiągnęła wszystkie zamierzone cele projektu doktorskiego i zweryfikowała postawione hipotezy badawcze, a sama dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Jednocześnie pragnę podkreślić, że wszystkie uwagi przedstawione w ocenie pracy mają charakter redakcyjny, część z nich dyskusyjny i nie mają one wpływu na pozytywną ocenę merytoryczną pracy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji dysertacja mgr inż. mgr inż. Eweliny Grygiel” Wpływ warunków wzrostu i przechowywania na zawartość związków biologicznie czynnych oraz aktywność przeciwutleniającą kiełków koniczyny (*Trifolium L.*)” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U z 2018, poz. 261) tym samym wnioskuję do Wysokiej Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o dopuszczanie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Michał Świeca