



Warszawa, 20.02.2025r.

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Gniewosz
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Instytut Nauk o Żywności SGGW w Warszawie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Plucińskiej-Krawczyk
pt. „Aktywność antyoksydacyjna i przeciwdrobnoustrojowa owoców *Lycium barbarum* L.”
Promotor: prof. dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska**

1. Podstawowe dane o Kandydatce

Pani mgr inż. Aleksandra Plucińska-Krawczyk ukończyła studia magisterskie na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej i uzyskała tytuł zawodowy magistra na kierunku biotechnologii w specjalności technologia fermentacji i mikrobiologia techniczna w obszarze kształcenia nauk technicznych w dniu 12 września 2018r. Następnie Kandydatka podjęła i ukończyła studia doktoranckie na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Pracę doktorską wykonała w Katedrze Cukrownictwa i Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Aliny Kunickiej-Styczyńskiej. W 2016r. mgr inż. Aleksandra Plucińska-Krawczyk odbyła 3-miesięczny naukowy staż w Iason GmbH w Graz w Austrii pt. „*Science for business – implementation od high quality internships for students of the Faculty of Biotechnology Food Sciences of Lodz University of Technology*”, współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego oraz w 2018r. kolejny 3-miesięczny staż naukowy w ramach projektu „Gospodarka dla nauki – wysokiej jakości staże dla studentów Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w polskiej firmie produkcyjno handlowej Kilargo. Czterokrotnie (2020r.,2021r.,2022r.) otrzymała nagrodę wspierającą doskonałość naukową pracowników, doktorantów i studentów PŁ w ramach programu „Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza”. Kandydatka jest współautorem 7 publikacji naukowych, w tym 6 ze wskaźnikiem Impact Factor (IF 35,341 i 868 pkt MNiSW). W latach 2017-2019 Kandydatka uczestniczyła w konferencjach naukowych, w większości w sesjach Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego oraz sesjach Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Łódzkiego, na których 12 razy prezentowała wyniki



badań naukowych w formie posterów, a 10 razy była pierwsza autorką. Załączona dokumentacja nie zawiera informacji, czy Kandydatka ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora oraz o przebiegu pracy zawodowej.

2. Informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Pani mgr inż. Aleksandra Plucińska-Krawczyk wykonała i przedstawiła do oceny rozprawę doktorską pt. „Aktywność antyoksydacyjna i przeciwdrobnoustrojowa owoców *Lycium barbarum* L.” Praca doktorska ma 198 stron, zadrukowanych jednostronnie. Pracę rozpoczęto od streszczenia i dodania słów kluczowych w języku polskim i angielskim. Łącznie w pracy zawarto 8 rozdziałów. Wstęp teoretyczny został opracowany na 19 stronach, Geneza pracy i hipotezy badawcze przedstawiono na 1 stronie. Opis Materiałów i metod zajął 27 stron. Dużą część pracy zajmuje rozdział "Wyniki" liczący 51 stron oraz rozdział „Dyskusja” liczący 19 stron. Wnioski opracowano na 3 stronach. Bibliografia zajęła 20 stron. Rozdział 8 zatytułowany „Załączniki” zawiera tabele ze szczegółowymi wynikami i zajmuje 37 stron. Wyniki badań przedstawione w pracy zilustrowano na 40 rysunkach oraz zawarto w 3 tabelach w rozdziale 4. „Wyniki” oraz w 38 tabelach w rozdziale 8. „Załączniki”. Praca jest kompletna, a układ pracy jest poprawny. Proporcja rozdziałów jest prawidłowa. Stwierdzam, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Aktualny stan wiedzy w zakresie tematyki badawczej rozprawy przedstawiono we Wstępie teoretycznym. Łącznie w dysertacji wykorzystano 188 pozycji literaturowych, w tym około 77% pochodziło z ostatnich 10 lat, a około 35% z ostatnich 5 lat. Praktycznie cała bibliografia jest opublikowana w języku angielskim. Tak duży odsetek bieżącej literatury dowodzi, że podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest aktualna. Doktorantka opisała roślinę *Lycium barbarum* L., wymagania glebowe i klimatyczne dla uprawy krzewów oraz regiony geograficzne tradycyjnych upraw kolcowoju, które znajdują się w północno-zachodnich Chinach, a także przedstawiła rolę jagód goji w chińskiej medycynie. Następnie zwróciła uwagę na wzrost popytu na jagody goji na świecie, co przekłada się na stały wzrost ich upraw. Ze względu na rosnącą chemizację upraw w krajach azjatyckich, uprawy te rozwijają się w innych częściach świata, w tym w Europie i również w Polsce.

- W mojej opinii, w tym miejscu brakuje omówienia państw, będących dużymi producentami jagód goji (poza Chinami). Z informacji podanych w dalszej części tego rozdziału można



wywnioskować, o które państwa europejskie chodzi, ale możliwe, że informacje te są niekompletne.

Następnie Doktorantka wymieniła najczęściej produkowane produkty na bazie jagód goji oraz szczegółowo omówiła ich skład chemiczny, uwzględniający makro- i mikroelementy, fitosterole, węglowodany, polifenole, karotenoidy i witaminy. Rozdział kończy się krótkim przedstawieniem aktywności przeciwdrobnoustrojowej wodnych ekstraktów z jagód goji. Na podstawie treści zawartych w tym rozdziale, bardzo pozytywnie oceniam poziom zaawansowania wiedzy teoretycznej mgr inż. Aleksandry Plucińskiej-Krawczyk z zakresu technologii żywności i żywienia w analizowanym obszarze. Moim zdaniem świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia wybranej tematyki badawczej.

W kolejnym rozdziale pt. „Geneza pracy i hipotezy badawcze” Doktorantka krótko przedstawiła uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej oraz sformułowała cztery hipotezy badawcze. Doktorantka słusznie zauważa lukę badawczą, związaną z niewielką liczbą opublikowanych badań aktywności biologicznych ekstraktów innych niż wodne i brakiem oceny mikrobiologicznej oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej gotowych produktów z jagód goji. Pierwsza hipoteza badawcza zakłada, że aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z jagód goji jest znaczna, niezależnie od warunków ekstrakcji. Kolejne trzy hipotezy zakładają, że suszone tradycyjnie i liofilizowane jagody goji są produktem spożywczym bezpiecznym mikrobiologicznie i nie zawierają bakterii *Bacillus cereus*; ekstrakty z jagód goji wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową w warunkach *in vitro*; oraz dodatek jagód goji do koktajlu mlecznego zwiększa jego stabilność mikrobiologiczną w warunkach opóźnionego chłodzenia. Postawione hipotezy są przedstawione w sposób jasny i precyzyjny. W rozdziale nie przedstawiono celu pracy, który można utożsamić z tytułem rozprawy, choć byłoby lepiej, gdyby został on określony w sposób precyzyjny i jednoznaczny.

W rozdziale „Materiały i metody” zaprezentowano szczegółowy zakres prac badawczych. Doktorantka przedstawiła materiał badawczy, na który składały się suszone i liofilizowane jagody goji, pochodzące z Chin z regionu NingXia, które są najbardziej poszukiwane i cenione wśród konsumentów oraz mleko o zawartości 3,2% tłuszczu. Materiałem biologicznym wykorzystywanym w pracy było także 6 szczepów mikroorganizmów referencyjnych. Opisano szczegółowo również pożywki mikrobiologiczne stosowane w części doświadczalnej pracy.



Metodyka badawcza zakładała przygotowanie ekstraktów z suszonych i liofilizowanych jagód goji przy użyciu 4 rozpuszczalników, z których następnie uzyskano liofilizaty. Następnie opisano metody oznaczania zawartości polifenoli ogółem, całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (za pomocą dwóch metod), ogólnej liczby drobnoustrojów zanieczyszczających jagody goji, badania cech hodowlanych, morfologicznych i biochemicznych bakterii, wykrywania *B. cereus*, badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów jagód goji oraz metodę modelowania prognostycznego. Do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów wybrano metodę krążkowo-dyfuzyjną oraz przyjęto klasyfikację wrażliwości mikroorganizmów na ekstrakty na podstawie badań Ponce i wsp. (2003). Modelowanie prognostyczne obejmowało identyfikację związków fenolowych w wodnym ekstrakcie z jagód goji metodą HPLC oraz wykorzystanie platformy mikrobiologii prognostycznej do prognozowania wzrostu *B. subtilis* w ekstrakcie z jagód goji i koktajlu mlecznym z tym dodatkiem. Ostatnim podrozdziałem jest analiza statystyczna wyników. W mojej ocenie badania przeprowadzono w oparciu o bardzo szerokie spektrum analizowanych parametrów, stosując dobrze dobrane i nowoczesne metody, co gwarantowało uzyskanie wiarygodnych wyników. Na podkreślenie zasługuje bardzo duża staranność Doktorantki w opisie i przedstawieniu krzywych kalibracyjnych w oznaczeniu zawartości polifenoli ogółem oraz całkowitej zdolności antyoksydacyjnej liofilizatów. Proszę o wyjaśnienie:

- Czy badane suszone i liofilizowane jagody goji pochodziły z jednej partii produktów, czy z różnych? W jaki sposób odbywało się pobieranie próbek do badań?
- W jaki sposób przygotowywano liofilizaty ekstraktów do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej? Proszę uzasadnić użycie metody krążkowo-dyfuzyjnej, a nie np. oznaczenia Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC) i Minimalnego Stężenia Bakteriobójczego/Grzybobójczego (MBC/MFC) ekstraktów.

W rozdziale 4 „Wyniki” Doktorantka przedstawiła wyniki badań składających się na niniejszą rozprawę. W I etapie dokonano ekstrakcji suszonych i liofilizowanych jagód goji przy użyciu roztworów dioksanu, tetr-butanolu, etanolu oraz wody w różnych warunkach temperaturowo-czasowych. Do oceny sposobu ekstrakcji i jakości uzyskanych ekstraktów wybrano oznaczenia sumy polifenoli oraz aktywność antyoksydacyjną ekstraktów. Na tej podstawie wykazano, że wszystkie uzyskane ekstrakty z jagód goji zawierały związki polifenolowe, przy czym temperatura, czas i zastosowany rozpuszczalnik miały znaczący wpływ na ekstrakcję związków bioaktywnych



z jagód goji. Wykazano, że całkowita zawartość polifenoli oraz aktywność antyoksydacyjna wzrastały wraz z czasem ekstrakcji i wzrostem temperatury. Najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazywały wszystkie ekstrakty po 48 h ekstrakcji w temperaturze 55°C. Na podstawie analizy korelacji potwierdzono korzystny wpływ zawartości związków polifenolowych na poprawę aktywności przeciwutleniającej otrzymanych ekstraktów.

W II etapie pracy najpierw oceniono bezpieczeństwo mikrobiologiczne suszonych i liofilizowanych jagód goji, a następnie aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów i liofilizatów ekstraktów. Stwierdzono brak obecności *B. cereus*, drożdży i pleśni, a ogólne zanieczyszczenie mikrobiologiczne jagód goji było na poziomie 3 i 5 jednostek logarytmicznych, co świadczy o zadawalającej jakości mikrobiologicznej. Do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybrano ekstrakty po 0,5 h ekstrakcji w temperaturze 25°C. Wykazano zróżnicowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów. Silniejsze działanie przeciwbakteryjne miały ekstrakty dioksanowe, a słabsze wodne. W trakcie obrony poproszę Doktorantkę o dyskusję:

- Jaka może być przyczyna silniejszego działania przeciwbakteryjnego ekstraktów dioksanowych od pozostałych ?
- Jakie są przyczyny braku aktywności przeciwpleśniowej wszystkich ekstraktów ?

W III etapie pracy mgr inż. Aleksandra Plucińska-Krawczyk podjęła się identyfikacji związków fenolowych w wodnym ekstrakcie z jagód goji. W ekstrakcie wykryto 23 związki z grupy flawan-3-oli, flawanoli oraz kwasów hydroksycynamonowych i kwasów hydroksybenzoesowych. Przebadany profil fenolowy w ekstrakcie potwierdził obecność m.in. katechiny, procyjanidyny B2, rutyny, kwasu 3-hydroksybenzoesowego, kwasu *p*-kumarowego i kwasu galusowego, które mają udokumentowane działanie przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe. Ciekawym aspektem tych badań było opracowanie modeli wzrostu bakterii *Bacillus subtilis* w wodnym ekstrakcie z jagód goji oraz koktajlu mlecznym, zawierającym suszone jagody goji, w dwóch wariantach przechowywania. Modele opracowano przy użyciu platformy mikrobiologii predykcyjnej ComBase. Potwierdzono zgodność modeli wzrostu bakterii w przygotowanych matrycach podczas przechowywania w warunkach symulujących opóźnione chłodzenie. Obserwowany mniejszy wzrost bakterii w stosunku do przewidywanego w modelu, Doktorantka trafnie tłumaczy działaniem związków fenolowych i innych związków o aktywności przeciwbakteryjnej, obecnych w jagodach goji. Podsumowując, podkreśla się skuteczność jagód goji w stabilizacji mikrobiologicznej użytego



w pracy produktu i możliwości dalszych badań w innych matrycach żywnościowych. Modele zostały zweryfikowane jako „nadprzewidujące, niezawodne” i mogą być stosowane do monitorowania stabilności mikrobiologicznej żywności nisko przetworzonej z dodatkiem jagód goji lub wodnego ekstraktu z jagód.

- W tym miejscu nasuwa się pytanie: Czy można przewidzieć, jaka minimalna ilość jagód goji lub ich wodnego ekstraktu będzie skuteczna w ochronie żywności niskoprzetworzonej?

Wszystkie wyniki uzyskane w badaniach zostały wnikliwie przedyskutowane z innymi wynikami opublikowanych badań w rozdziale 5. „Dyskusja wyników”. Moim zdaniem ta część rozprawy prezentuje wysoki poziom merytoryczny.

Pracę kończy rozdział zawierający wnioski. W mojej ocenie są one sformułowane poprawnie, w pełne uzasadnione i mają mocne podstawy w przedstawionych wynikach pracy.

- Doktorantka nie skomentowała, czy uzyskane wyniki pozwalają na weryfikację postawionych hipotez. W trakcie obrony proszę wypełnić to podsumowanie.

Jako recenzent zwracam uwagę na pewne niedociągnięcia w rozprawie, w tym:

- str. 18: dwa razy użyto sformułowania „poziomu najwyższego TSS” zarówno u owoców żółtych, jak i czarnych goji,
- str. 22: w rozprawie brak Tabeli 2-2,
- str. 23: niezręczność stylistyczna: „ badania jagód... wzbogacono o zawartość germanu...”,
- str. 25: w tytule podrozdziału 1.5.2. nie potrzebne jest słowo „węglowodany”, bo są one omówione w kolejnym podrozdziale 1.5.3. pt. Węglowodany,
- str. 60: czy profil II zakładał inkubację w 23 °C, jak na rysunku 3-4, czy w temperaturze 22,5 °C, jak w tekście,
- str. 60: zamiast liczby $8,5 \times 10^{-5}$ jtk/ g, powinno być $8,5 \times 10^5$ jtk/ g,
- str. 63-66 / na wykresach od 4-1 do 4-4: opis jednostki na osi OY powinien być „wydajność [%]” zamiast „waga ekstraktu [g]”,
- str. 68: dwa razy w zdaniu użyto „po ekstrakcji”,
- str. 98 tekst i wykres 4-32: Na wykresie są inne liczby drobnoustrojów mezofilnych (1 log jtk/g i 2,2 log jtk/g) niż w tekście (liczby $2,0 \times 10^5$ jtk/g i $1,0 \times 10^3$ jtk/g, czyli 5 i 3 log jtk/g),
- str. 129: błąd w nazwie kwasu *p*-kumarowego.

Przedstawione uwagi nie umniejszają wartości naukowej pracy.



W mojej opinii, w swojej rozprawie mgr inż. Aleksandra Plucińska-Krawczyk podjęła bardzo interesujących problem badawczy dotyczący aktywności antyoksydacyjnej i przeciwdrobnoustrojowej owoców *Lycium barbarum* L. (znanych jako jagody goji). Wyniki badań zawarte w rozprawie potwierdzają działanie przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe jagód goji oraz wskazują na duże potencjalne korzyści wynikające ze stosowania suszonych jagód goji lub wodnego ekstraktu w celu utrzymania jakości żywności nisko przetworzonej. W mojej ocenie, Doktorantka przedstawiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego o dużym potencjale aplikacyjnym.

Oceniana rozprawa doktorska wykazuje bardzo dobry poziom merytoryczny prowadzonych badań, ich poprawność metodyczną i wysoki poziom merytorycznej dyskusji. W mojej opinii rozprawa doktorska wnosi istotny wkład poznawczy i aplikacyjny do nauki w dyscyplinie technologia żywności i żywienia oraz świadczy o umiejętnościach mgr inż. Aleksandry Plucińskiej-Krawczyk do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej od sformułowania problemu, hipotez badawczych poprzez ich realizację w odpowiednio dobranych eksperymentach aż po syntetyczne wnioski.

Podsumowanie

Recenzowana praca doktorska to niewątpliwie rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i wartościowe, które w znaczący sposób poszerzają wiedzę na temat potencjału przeciwutleniającego i przeciwdrobnoustrojowego owoców *Lycium barbarum* L. i projektowania nowych niskoprotworzonych produktów z zastosowaniem jagód goji. Mgr inż. Aleksandra Plucińska-Krawczyk udowodniła, że posiada szeroką wiedzę w poruszanej tematyce i jest dobrze przygotowana do prowadzenia pracy naukowo-badawczej.

Rozprawa doktorska „Aktywność antyoksydacyjna i przeciwdrobnoustrojowa owoców *Lycium barbarum* L.” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 - 4 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz.1668 ze zm.). W związku z powyższym składam do Rady dyscypliny technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Plucińskiej-Krawczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Celon