



Poznań, 24.07.2026

Prof. UPP dr hab. Barbara Stachowiak
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Kamila Królaka
pt. „Stabilność związków kształtujących potencjał funkcjonalny napojów zielonej herbaty”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Edyty Kordialik-Bogackiej, prof. Politechniki Łódzkiej oraz promotora pomocniczego dr inż. Sylwii Ścieszki (Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka)

PODSTAWA FORMALNO-PRAWNA PRZYGOTOWANIA RECENZJI

Niniejszą recenzję wykonano w odpowiedzi na Uchwałę nr 15/2026 z dn. 20.05.2026 r. podjętą przez Radę Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Politechniki Łódzkiej oraz pisma Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej Pani Prof. dr hab. Edyty Gendaszewskiej-Darmach z dn. 27.05.2026 r. Recenzję wykonano w oparciu o przepisy Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 z późn. zm).

Przesłana do recenzji dokumentacja:

- Wydruk rozprawy doktorskiej
- Wykaz opublikowanych prac naukowych, w tym innych osiągnięć naukowych (pkt. 5) z dn. 23.04.2026
- Opinia opiekuna naukowego na temat rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Kamila Królaka z dn. 14.04.2026
- Opinia promotora pomocniczego z dn. 20.04.2026
- Dyplom ukończenia studiów drugiego stopnia w formie stacjonarnej przez Pana Kamila Królaka z dn. 02.09.2021
- Zaświadczenie o ukończeniu kształcenia w Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej Politechniki Łódzkiej oraz uzyskaniu efektów uczenia się dla kwalifikacji na poziomie 8 Polskiej Ramy Kwalifikacji
- Zaświadczenie Centrum Językowego Politechniki Łódzkiej potwierdzające kompetencje językowe z angielskiego na poziomie B2 wg skali ESOKJ Pana Kamila Królaka z dn. 14.04.2026

W dostarczonych materiałach nie znalazłam informacji, czy Kandydat ubiegał się uprzednio o nadanie stopnia doktora. W dostępnych bazach danych również nie znalazłam takiej informacji.

1. INFORMACJE OGÓLNE O KANDYDACIE

Pan mgr Kamil Królak ukończył w 2021 roku studia stacjonarne drugiego stopnia na kierunku biotechnologia, specjalność: żywność i napoje fermentowane, na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności (WBiNoŻ) Politechniki Łódzkiej (PŁ), uzyskując tytuł magistra inżyniera. W latach 2021–2026

realizował program kształcenia Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej Politechniki Łódzkiej. Badania w ramach rozprawy doktorskiej prowadził głównie w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii na macierzystym wydziale pod kierunkiem dr hab. inż. Edyty Kordalik-Bogackiej, prof. Politechniki Łódzkiej, oraz promotora pomocniczego dr inż. Sylwii Ścieszki.

Analiza dorobku naukowego Doktoranta wskazuje, że jego zainteresowania koncentrują się w obszarze technologii żywności, zwłaszcza napojów roślinnych takich jak napary zielonej herbaty, kombucha i piwo. Główny nurt prac obejmuje ocenę wpływu ekstrakcji i fermentacji na skład, stabilność oraz aktywność przeciwutleniającą polifenoli, ze szczególnym uwzględnieniem epikatechin, a także ich przemiany podczas symulowanego trawienia. Istotnym obszarem są również zagadnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego, w tym ryzyko rozwoju *Bacillus cereus* w niskotemperaturowo przygotowywanych napojach oraz naturalne metody ograniczania wzrostu bakterii. Całość, świadczy o spójnym rozwoju zainteresowań i umiejętnym łączeniu wiedzy z zakresu technologii, chemii i mikrobiologii żywności.

Dorobek publikacyjny Doktoranta (włączając prace wskazane jako podstawa rozprawy doktorskiej) obejmuje 7 publikacji oryginalnych, w tym 5 opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR): *LWT – Food Science and Technology*, *Food Chemistry*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *Scientific Reports* oraz *European Food Research and Technology*. Według danych przedstawionych przez Doktoranta dorobek ten odpowiada 630 punktom MEiN, a jego sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) wynosi 27,6. Z moich wyliczeń wynika jednak, że łączny IF jest wyższy i osiąga wartość 29,4, przy uwzględnieniu pięcioletniego współczynnika $IF = 7,4$ dla czasopisma *LWT – Food Science and Technology*, ponieważ wartość IF za rok 2026 nie została jeszcze opublikowana (artykuł jest z 2026 r.).

Na podkreślenie zasługuje rosnąca rozpoznawalność publikacji Doktoranta. Przykładowo, artykuł opublikowany w czasopiśmie *Food Chemistry* w 2025 roku został dotychczas zacytowany 12 razy według bazy Scopus oraz 11 razy według bazy Web of Science.

Uzupełnieniem dorobku publikacyjnego jest współautorstwo 12-stu doniesień konferencyjnych, w tym 3-ch prezentowanych na konferencjach krajowych oraz 9-ciu na konferencjach międzynarodowych. Doktorant jest ponadto współautorem 6-ciu sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie GenBank prowadzonej przez National Center for Biotechnology Information (NCBI).

W latach 2021–2023 Pan mgr Kamil Królak uczestniczył w realizacji dwóch projektów badawczo-rozwojowych finansowanych przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju: „Opracowanie i wdrożenie innowacyjnej technologii produkcji kombuchy” (POIR.01.01.01-00-0910/20-00) oraz „Opracowanie i wdrożenie technologii produkcji piwa bezalkoholowego typu gruit” (POIR.04.01.04-00-0099/19).

Istotnym elementem rozwoju naukowego Doktoranta był dwumiesięczny staż naukowy (6.01 – 9.03.2025) w Institute for Nutritional and Food Sciences, Faculty of Agricultural, Nutritional and Engineering Sciences, University of Bonn (Niemcy). W trakcie stażu, w zespole prof. Benno F. Zimmermanna — wybitnego europejskiego specjalisty w dziedzinie badań nad zieloną herbatą — Doktorant prowadził badania nad analizą profilu epikatechin poszerzając swoje umiejętności w zakresie nowoczesnych metod analitycznych.

2. PRZEDSTAWIENIE INFORMACJI O OCENIANEJ ROZPRAWIE DOKTORSKIEJ

2.1. OCENA FORMALNA PRACY

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Kamila Królaka, pt. „**Stabilność związków kształtujących potencjał funkcjonalny napojów zielonej herbaty**” liczy 129 stron i obejmuje następujące części: streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie do problematyki badawczej (pkt. 1), genezę pracy i hipotezy badawcze (pkt. 2), cel i zakres pracy (pkt. 3), wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy (pkt. 4), opis materiałów i metod badawczych (pkt. 5), omówienie wyników badań (pkt. 6), podsumowanie (pkt. 7), wnioski (pkt. 8) oraz literaturę uzupełniającą (pkt. 9). Zamieszczono w niej również kopie publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej (3 publikacje) (pkt. 10) wraz z oświadczeniami współautorów nt. ich wkładu w powstałe artykuły (pkt. 11). W ostatniej części opracowania Doktorant podsumował swoje osiągnięcia naukowo-badawcze (pkt. 12).

Struktura rozprawy odpowiada wymaganiom stawianym pracom przygotowanym w formie cyklu publikacji. Pewne zastrzeżenie budzi kolejność przedstawienia genezy pracy i hipotez badawczych przed sformułowaniem celu pracy. Z metodologicznego punktu widzenia bardziej uzasadnione byłoby wcześniejsze określenie celu badań, z którego wynikają przyjęte hipotezy badawcze.

Ocena formalna cyklu publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

Zgodnie z deklaracją Doktoranta (pkt. 4), w skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. Oracz J., **Królak K.**, Kordialik-Bogacka E., Żyżelewicz D. (2025): Optimizing brewing conditions for low-temperature green tea infusions: Insights into functional and nutritional properties. *Food Chemistry*, 474, 143241 (IF₂₀₂₅: 10,4; liczba cytowań: 11 (Web of Science)/12 (Scopus))
2. **Królak K.**, Kordialik-Bogacka E., Ścieszka S., Zimmermann B.F. (2026): Improved *in vitro* digestive stability of epicatechins in green tea infusion fermented by kombucha SCOBY. *LWT – Food Science and Technology*, 242, 119142 (IF_{5-letni}: 7,4)
3. **Królak K.**, Ścieszka S., Kordialik-Bogacka E., Oracz J., Ditrych M., Szczygiał T., Dybka-Stępień K., Otlewska A., Żyżelewicz D. (2024): Antibacterial efficacy of berry juices against *Bacillus cereus* relative to their phytochemical composition and antioxidant properties. *Scientific Reports*, 14(1), 28298 (IF₂₀₂₄: 3,9; liczba cytowań: 2 (Web of Science/Scopus))

W/w prace mają charakter eksperymentalny i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych z listy Journal Citation Reports (JCR) w latach 2024-2026. Zgodnie z deklaracją Doktoranta, sumaryczny IF publikacji wynosi 20,3, a łączna suma punktów, zgodnie z wykazem MNiSW, z roku publikacji to 440. Wg moich wyliczeń wskaźnik IF jest wyższy i wynosi 21,7. Uzyskanie tak wysokich parametrów naukowych, uważam za duży sukces Doktoranta. Pomimo, że prace są wieloautorskie (czterech i dziewięciu współautorów), to należy podkreślić, że jest On pierwszym autorem dwóch z nich, natomiast we wszystkich jest autorem korespondencyjnym.

Ponadto, na podstawie załączonych oświadczeń o współautorstwie, można wnioskować, że wkład Kandydata w powstanie w/w publikacji był znaczący, a nawet wiodący. Polegał na tworzeniu lub współtworzeniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii badawczej, samodzielnym przeprowadzeniu większości doświadczeń i wykonaniu analiz laboratoryjnych. Istotnym elementem Jego wkładu było również gromadzenie danych, ich analiza, w tym analiza statystyczna i wizualizacja.

Ponadto należy podkreślić, że Doktorant był odpowiedzialny za przygotowanie pierwszych wersji wszystkich manuskryptów, ich redakcję oraz złożenie do publikacji w czasopismach naukowych.

Wydruk rozprawy doktorskiej zawiera również informacje dotyczące wyników niepublikowanych, w tym metodykę (pkt. 5.5.), ich omówienie (pkt. 6) oraz wnioski (pkt. 8, wnioski 3 i 4), co stoi w sprzeczności z deklaracją Doktoranta (pkt. 4) i stanowi element zaskoczenia dla Recenzenta. W pkt. 4 należało wyraźnie zaznaczyć, że rozprawa ma charakter hybrydowy. Zgodnie z ustawą - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 z późn. zm) oraz komunikatem 19/2020 Rady Doskonałości Naukowej - w sprawie składania rozpraw doktorskich z dn. 09.11.2020., taka forma rozprawy jest dopuszczalna.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca spełnia wymogi formalne stawiane dysertacjom na stopień doktora.

2.2. OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Na wstępie chciałabym zaznaczyć, że tytuł rozprawy „Stabilność związków kształtujących potencjał funkcjonalny napojów zielonej herbaty” nie w pełni odzwierciedla jej treść, co znacząco utrudniło ocenę pracy. Badania zaprezentowane w rozprawie obejmują dwa wyraźnie różne obszary: **(1) analizę stabilności epikatechin** w różnych procesach technologicznych i po ekspozycji na warunki symulowanego trawienia, oraz **(2) aspekt bezpieczeństwa mikrobiologicznego** związanego z możliwością rozwoju *Bacillus cereus* podczas niskotemperaturowej ekstrakcji zielonej herbaty. W mojej opinii, w rozprawie oba te obszary potraktowano równie istotne i trudno wskazać jeden jako wiodący. Zakres badań przeprowadzonych przez Doktoranta w obu obszarach był porównywalny, a uzyskane wyniki mają istotne znaczenie poznawcze i aplikacyjne. Należy jednak przyznać, że w praktyce oba wątki koncentrują się na ekstrakcie zielonej herbaty. Swój dwoisty zamysł badawczy, Doktorant dobrze zaznaczył w celu pracy (rozwinięciem są cele szczegółowe) i uzasadnił w rozdziale 2 – Geneza pracy i hipotezy badawcze. Potwierdza to przekonanie, że tytuł rozprawy jest mylący i bardzo utrudnił odbiór i ocenę pracy.

Dobór tematyki badawczej

Podjęta tematyka badawcza jest aktualna, naukowo istotna oraz w pełni uzasadniona. W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny wzrost zainteresowania żywnością funkcjonalną, w tym napojami pochodzenia roślinnego, których spożycie wiąże się z korzystnym wpływem na zdrowie człowieka. Napar z zielonej herbaty – wodny ekstrakt z „nieutlenionych” liści *Camellia sinensis* (L.) Kuntze – stanowi jedno z najbogatszych źródeł związków polifenolowych w diecie, a w szczególności monomerycznych flawan- 3 -oli, głównie galusanu epigallokatechiny (EGCG), epigallokatechiny (EGC), galusanu epikatechiny (ECG) i epikatechiny (EC), łącznie określanych jako epikatechiny. Ich znamioną cechą jest wysoka aktywność przeciwutleniająca oraz zdolność do oddziaływań biomolekularnych. Z tego powodu zielona herbata i napoje przygotowywane na jej bazie cieszą się od lat nieustannie rosnącym zainteresowaniem świata nauki, konsumentów i producentów jako obiecujące środki w profilaktyce i wspomaganiu leczenia nowotworów i przewlekłych chorób metabolicznych, których podłożem jest stres oksydacyjny. Niemniej jednak, jak wskazuje Doktorant, związek przyczynowo-skutkowy między spożyciem epikatechin zielonej herbaty, a poprawą lub utrzymaniem prawidłowych funkcji fizjologicznych organizmu człowieka, pozostaje jak dotąd nieudowodniony. Ważnym aspektem w tym

obszarze jest ich biodostępność, która nierozzerwalnie wiąże się ze stabilnością tych związków. Podkreśla się, że epikatechiny charakteryzuje ograniczona stabilność podczas przygotowania naparów, procesów technologicznych oraz trawienia w przewodzie pokarmowym, co może istotnie wpływać na ich biodostępność, a tym samym skuteczność i realne oddziaływanie prozdrowotne w organizmie. Z tego względu identyfikacja czynników determinujących stabilność tych związków ma istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne.

W rozprawie Doktorant podjął również ważny aspekt bezpieczeństwa mikrobiologicznego niskotemperaturowo przygotowywanych ekstraktów zielonej herbaty, wskazując możliwość wykorzystania soków z owoców jagodowych jako naturalnych czynników ograniczających wzrost *Bacillus cereus*. Choć wątek ten, w mojej opinii, nie jest w żaden sposób spójny z pozostałymi badaniami zaprezentowanymi w rozprawie i powinien być z niej wykluczony, doceniam intencje Doktoranta. Takie podejście odpowiada współczesnym trendom zmierzającym do ograniczania stosowania syntetycznych konserwantów na rzecz naturalnych substancji o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Wprowadzenie (pkt. 1)

W tej części pracy Doktorant skupił się na kluczowych epikatechinach obecnych w zielonej herbacie, ich budowie i klasyfikacji oraz istotnych przemianach zachodzących pod wpływem różnych procesów i parametrów technologicznych. Szeroko omówił wpływ temperatury, czasu ekstrakcji, rodzaju wody oraz formy herbaty na stabilność oraz biologiczną aktywność tych związków. Ważnym elementem tej części jest także charakterystyka stabilności epikatechin w warunkach symulowanego trawienia. Przedstawione treści są spójne z publikacjami 1 i 2 i pozwalają w znakomity sposób zrozumieć, prześledzić i ocenić zamysł badawczy Doktoranta prezentowany w tych pracach, sposób jego realizacji, interpretację otrzymanych wyników badań, i wyciągnięte na ich podstawie konkluzje. Na uznanie zasługuje cytowana literatura, która odzwierciedla wyczerpująco aktualny poziom wiedzy z zakresu tej tematyki badawczej. Tę część pracy oceniam bardzo wysoko.

Chciałabym podkreślić, że w pkt. 1. Wprowadzenie nie poruszono zagadnień związanych z bezpieczeństwem mikrobiologicznym ekstraktów zielonej herbaty. Sugeruje to, że praca doktorska koncentruje się tylko na wątku epikatechin. Tło i kontekst badawczy dotyczący *B. cereus* wyjaśniono w pkt. 2, przy okazji opisu genezy poszczególnych hipotez. Z uwagi na fakt, że badania poświęcone ocenie ryzyka mikrobiologicznego z udziałem tych bakterii stanowią połowę pracy, uważam, że zagadnienia z tego obszaru powinny znaleźć się w pkt. 1. Wprowadzenie, jako równie istotne jak epikatechiny i ich stabilność.

Cel pracy i hipotezy badawcze (pkt. 2-3)

Głównym celem badań Doktoranta było określenie wpływu procesów przygotowania i przetwarzania napojów zielonej herbaty na stabilność epikatechin w warunkach *in vitro*, z uwzględnieniem oceny ryzyka mikrobiologicznego w systemie niskotemperaturowej ekstrakcji oraz możliwości jego ograniczenia. Realizację tego celu Doktorant zaplanował poprzez wyodrębnienie następujących celów szczegółowych:

1. Ocenę wpływu niskotemperaturowej ekstrakcji wodnej zielonej herbaty na profil epikatechin w napojach herbacianych

2. Ocenę wpływu procesu fermentacji napoju zielonej herbaty z użyciem kultury SCOOPY na stabilność epikatechin w warunkach symulowanego trawienia żołądkowo-jelitowego
3. Ocenę wzrostu bakterii z gatunku *B. cereus* w warunkach niskotemperaturowej ekstrakcji wodnej zielonej herbaty
4. Zbadanie wpływu soków z owoców jagodowych na wzrost *B. cereus*.

Cele szczegółowe 1 i 2 koncentrują się na analizie profilu i stabilności epikatechin w napojach zielonej herbaty oraz wpływie fermentacji na ich zachowanie podczas trawienia *in vitro*, podczas gdy 3 i 4 dotyczą zagadnień mikrobiologicznych związanych z wzrostem bakterii *Bacillus cereus*. Zatem grupy tych celów dotyczą dwóch różnych obszarów badawczych: chemii bioaktywnych związków i bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Ta rozbieżność sprawia, że cele szczegółowe nie tworzą spójnej, konsekwentnej całości, co utrudnia logiczne powiązanie wyników i wniosków w ramach jednej rozprawy doktorskiej. Dlatego właśnie w tym miejscu, a nie w niepotrzebnie wydzielonym pkt. 2., Doktorant powinien wyraźnie wskazać element łączący te obszary lub sposób, w jaki się wzajemnie uzupełniają.

Po analizie dostarczonego do recenzji materiału uważam, że cel szczegółowy 1 powinien dotyczyć nie tylko oceny profilu epikatechin w napojach herbacianych, ale również ich zawartości, co zostało szeroko omówione w publikacji 1 oraz przedłożonej do oceny rozprawie doktorskiej.

Ponadto, cel 4 jest niespójny z celem głównym rozprawy; tj. nie wynika z niego jednoznacznie, że badanie wpływu soków z owoców jagodowych stanowi element oceny możliwości ograniczenia ryzyka mikrobiologicznego napojów zielonej herbaty.

Sposób realizacji celów szczegółowych przedstawiony został w publikacjach 1-3, oraz w zamieszczonych w ramach pracy materiałach niepublikowanych. Przeprowadzając zaplanowane badania, Doktorant postawił cztery, jak określił falsyfikowalne hipotezy badawcze, w których założył, że:

1. Proces ekstrakcji zielonej herbaty z użyciem wody destylowanej w temperaturze 5 lub 20 °C prowadzony przez 2-12 godzin znacząco zwiększa stężenia EGC i EC w napoju herbacianym w porównaniu do wartości uzyskanych w przypadku procesu 30-minutowej ekstrakcji herbaty mielonej (<500 µm) w stałej temperaturze
2. Po ekspozycji na warunki symulowanego trawienia żołądkowo-jelitowego stężenie epikatechin ogółem, a w szczególności EGC, jest istotnie wyższe w napoju typu kombucha otrzymanym z zielonej herbaty niż w napoju niefermentowanym
3. Po 12 godzinach wodnej ekstrakcji zielonej herbaty w 20 °C liczba komórek wegetatywnych *Bacillus cereus* utrzymuje się na poziomie $\geq 3 \log \text{ jtk/mL}$
4. Soki z owoców czarnego bzu, czarnej aronii, czarnej porzeczki oraz żurawiny wielkoowocnikowej hamują wzrost *B. cereus* podczas 24-godzinnej inkubacji w płynnym podłożu wzrostowym TSB w stosunku do próby kontrolnej

Postawiona przez Doktoranta hipoteza 4 jest niespójna z celem głównym, co jest konsekwencją przyjętego celu szczegółowego 4. Poza tym zastrzeżenia budzi sposób sformułowania hipotez 1 oraz 3 i 4. Zawierają one liczne szczegóły metodyczne (czas ekstrakcji, temperatura, rodzaj podłoża, wartości liczbowe), które powinny znaleźć się w opisie metodyki, a nie w hipotezach badawczych. W konsekwencji hipotezy mają charakter przewidywanych wyników ukierunkowanych doświadczeń, a nie ogólnych założeń naukowych dotyczących zależności między badanymi czynnikami, np. hipoteza 3 nie jest w ogóle hipotezą, tylko przewidywanym efektem/wynikiem badań z konkretną wartością graniczną. W tej kwestii nie przekonują mnie obszernie wyjaśnienia Doktoranta, dlaczego hipotezy

badawcze zostały sformułowane tak drobiazgowo (pkt. 2). Efektem konieczności ich weryfikacji są niespójnie zaplanowane badania.

Ponadto, pragnę zaznaczyć, że cel główny pracy (wraz z celami szczegółowymi) i hipotezy badawcze zostały rozdzielone i przedstawione w dwóch odrębnych punktach, odp. pkt. 3 i pkt. 2. Rozdzielenie tych elementów zaburza przejrzystość rozprawy i bardzo utrudnia dostrzeżenie spójności/związku pomiędzy nimi. Oba elementy powinny być przedstawione razem, tak by cele szczegółowe i odpowiadające im hipotezy tworzyły jedno logiczne i powiązane ze sobą wyrażenie intencji badawczych. Ponadto hipotezy powinny wynikać bezpośrednio z celów badawczych, będąc ich testowalnymi założeniami, tymczasem umieszczono je przed nimi, wraz z szerokim wyjaśnieniem genezy ich uszczegółowienia. W mojej opinii pkt. 2 to drugi przegląd literaturowy, a informacje w nim zawarte powinny się znaleźć w pkt. 1. Wprowadzenie, o czym wspomniałam powyżej. Myślę, że tę logikę zauważa sam Doktorant, gdyż w pierwszym zdaniu, w pkt. 2 podaje, że informacje przedstawione w rozdziale 1, tj. Wprowadzenie posłużyły do zidentyfikowania problemów badawczych i sformułowania hipotez. Tymczasem, jak również wspomniałam powyżej, w rozdziale tym nie ma informacji nt. zagrożeń mikrobiologicznych ekstraktów zielonej herbaty, w tym związanych z rozwojem bakterii *B. cereus*.

Materiały i metody (pkt. 5)

Rozdział ten został podzielony na sześć podrozdziałów. Niepotrzebnie wyodrębniono podrozdziały 5.1.-5.3, tj. oddzielnie Materiał badawczy (gdzie wskazano na zieloną herbatę i soki owocowe), Materiał biologiczny (wskazano SCOBY i szczepy *B. cereus*) i Podłoża mikrobiologiczne. Wszystkie te elementy powinny się znaleźć w jednym nagłówkiem Materiał badawczy.

W podrozdziale 4 przedstawiono w sposób bardzo przejrzysty modele eksperymentalne badań opisanych w publikacjach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Model eksperymentalny dotyczący publikacji 3 (rys. 6) wyraźnie dowodzi braku spójności z tematem rozprawy (podobnie jak wspomniane wyżej cel szczegółowy 4 i weryfikowana w tej publikacji hipoteza 4). Uważam, że bez umniejszenia wartości rozprawy, publikacja ta nie powinna być włączona w cykl publikacji/badań będących przedmiotem rozprawy, ponieważ stanowi całkowicie odrębną tematycznie pracę. W pracy tej oceniono bowiem skuteczność 4-ch soków jagodowych oraz ich frakcji fenolowych i antocyjanowych w hamowaniu wzrostu dwóch szczepów *Bacillus cereus* w podłożu TBS, a nie w środowisku ekstraktu zielonej herbaty. Wykorzystanie w badaniach nowo wyizolowanego szczepu z zielonej herbaty - *B. cereus* AK1 jest jedynym elementem łączącym tę pracę z pozostałymi badaniami. Uważam jednak, że jest to zbyt luźny element łączący. Jak sam Kandydat zaznacza (str. 53 rozprawy), otrzymane w ramach publikacji wyniki stanowią dopiero perspektywę do dalszych badań nad wykorzystaniem antocyjanów jako dodatków stabilizujących napój zielonej herbaty podczas niskotemperaturowej ekstrakcji.

W podrozdziale 5.5. przedstawiono metodykę do badań dotyczącą wyników niepublikowanych. Przedstawiono w nim sposób izolacji czystych kultur bakterii mezofilnych z napoju zielonej herbaty (ppkt. 5.5.1.), sposób ich identyfikacji z wykorzystaniem metod biologii molekularnej (ppkt. 5.5.2. – 5.5.5.), a także metodę analizy wzrostu *B. cereus* w ekstraktach zielonej herbaty (ppkt. 5.5.6.). Zaproponowany opis doświadczeń w tym podrozdziale jest mało przejrzysty i źle zorganizowany. Przede wszystkim dlatego, że opis przebiegu identyfikacji bakterii nie został wydzielony jako odrębna całość. Zamiast tego poszczególne techniki, takie jak izolacja DNA, PCR, elektroforeza czy sekwencjonowanie zostały przedstawione jako niezależne procedury, bez wyraźnego powiązania ze

sobą. Utrudnia to zrozumienie nie tylko przebiegu procesu identyfikacji, ale również całego układu doświadczeń prezentowanych w tym miejscu. Ponadto, dobrym rozwiązaniem byłoby przedstawienie układu badań niepublikowanych w postaci modelu – konsekwentnie, jak w przypadku publikacji 1-3 (rys. 4-6).

W ostatnim podrozdziale 5.6. tej części rozprawy, w tabeli 2 zestawiono procesy technologiczne, metody badawcze oraz wykaz aparatury

W związku z podrozdziałem 5.5., proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

- Pomimo oczywistych przesłanek dotyczących potrzeby kontroli bakterii *Bacillus cereus* w napojach z zielonej herbaty otrzymywanych w warunkach niskotemperaturowej ekstrakcji, które Doktorant szeroko omawia w pkt. 2, brakuje mi kompleksowej oceny poziomu skażenia mikrobiologicznego wyjściowych suszy herbacianych oraz otrzymanych na ich bazie napojów. Czy takie analizy zostały przeprowadzone? Dostarczenie tych informacji umożliwiłoby szerszą ocenę wpływu niskotemperaturowej ekstrakcji na bezpieczeństwo mikrobiologiczne napoju, jak również na jego skład chemiczny. Pytanie to nasuwa się w związku z publikacją 3 - w sokach jagodowych obecne są cukry, które mogą intensyfikować rozwój drożdży i produkcję alkoholu, a nie oceniano wpływ soków na tę grupę drobnoustrojów.

- W przypadku szacowania ryzyka mikrobiologicznego niskotemperaturowych ekstraktów zielonej herbat, warto byłoby uwzględnić również ocenę wpływu warunków ekstrakcji na zawartość cukrów w napoju, które należą do kluczowych czynników warunkujących rozwój drobnoustrojów.

- Jaki był sens zamieszczenia w rozprawie tabeli 1? Przedstawiono w niej 6 różnych wariantów niskotemperaturowej ekstrakcji w procesie przygotowania napojów herbacianych z informacją, że wyizolowano z nich 6 czystych kultur bakterii (po jednej z każdego wariantu napoju) (pkt. 5.5.1.). Ta informacja to rezultat badań i nie rozumiem dlaczego znalazła się w części metodycznej. Ponadto, tylko jeden izolat - *B. cereus* AK1, wskazany zresztą w pkt. 5.2.2., wykorzystano w badaniach przeprowadzonych w ramach rozprawy.

W tabeli 1, warianty ekstrakcji 4 i 5 niczym się nie różnią - przypuszczam, że to błąd zapisu. Oprócz tego, w przypadku wariantów 2-5 podano, że do przygotowania napojów użyto mieszanek herbat zieloną i czarną, co jest niespójne z tematem rozprawy doktorskiej, pozostałymi badaniami zrealizowanymi w jej ramach oraz samym nagłówkiem pod którym je umieszczono (pkt. 5.5.1). Ponadto Doktorant wyraźnie zaznaczył, że w rozprawie uwzględnił tylko wariant 1 ekstrakcji i otrzymanego w jej rezultacie napoju, z którego właśnie pochodził *B. cereus* AK1, jak wspomniano wyżej, jedyny izolat wykorzystany w badaniach Doktoranta.

- Doświadczenia dotyczące identyfikacji wszystkich izolatów są bez związku z tematyką rozprawy, celem głównym i szczegółowymi. Nie zaznaczono ich też w hipotezach badawczych. Niepotrzebnie zamieszczono je w pracy. W mojej opinii wystarczające informacje nt. źródła pochodzenia mikroorganizmów wykorzystywanych w ramach realizacji rozprawy doktorskiej, w tym również szczepu *B. cereus* AK1, zamieszczono w pkt. 5.2. Tu brakuje tylko przedstawienia metod ich przechowywania/zabezpieczenia przed wykorzystaniem w badaniach.

- W pkt. 5.5.6. nie wskazano w jakiej pojemności naczyniach prowadzono hodowle inokulum oraz doświadczenia dotyczące analizy wzrostu *B. cereus* w ekstraktach zielonej herbaty? Czy były to warunki statyczne?

Omówienie wyników badań (pkt. 6)

W tej części pracy Doktorant przedstawia wyniki badań, które zostały opublikowane w załączonych publikacjach 1-3 (pkt. 10) oraz wyniki uzyskane w ramach badań niepublikowanych, weryfikując kolejno hipotezy badawcze.

Publikacja 1

Praca stanowi wartościowe i kompleksowe studium wpływu różnych warunków ekstrakcji na zawartość i stabilność bioaktywnych związków zielonej herbaty oraz na potencjał przeciwutleniający napojów, przygotowywanych w skali półprzemysłowej (100 litrów). W badaniach uwzględniono trzy kluczowe zmienne: (1) rodzaj wody (destylowana vs. wodociągowa), (2) parametry ekstrakcji (temperaturę i czas), w tym tradycyjne krótkotrwałe zaparzenie w 85°C (10 i 30 minut) oraz długotrwałe ekstrakcje w niskich temperaturach 5°C i 20°C (2- 12 godzin), a także (3) formę liści (całe vs. zmielone). Analizowano wpływ powyższych zmiennych na zawartość i profil polifenoli, ze szczególnym uwzględnieniem epikatechin (flawan- 3-oli): EGC, EC, EGCG i ECG, skład mineralny, metyloksantyny, witaminy, wolny azot aminowy (FAN) oraz potencjał antyoksydacyjny (przeciwrodnikowy - DPPH i redukujący – FRAP). Próbę referencyjną stanowił napój uzyskany w wyniku 30-minutowej ekstrakcji herbaty mielonej z udziałem wody destylowanej w stałej temperaturze 85 °C.

Otrzymane wyniki wyraźnie wskazały, że rodzaj wody zastosowanej w procesie ekstrakcji był krytycznym czynnikiem determinującym stężenia większości badanych związków bioaktywnych. Jednoznacznie wykazano, że woda wodociągowa (o wyższej zawartości związków mineralnych niż destylowana) nie powinna być raczej stosowana do niskotemperaturowej produkcji napojów zielonej herbaty niezależnie od użytej formy liści, gdyż obniża ich potencjał prozdrowotny.

Ekstrakcje prowadzone z udziałem wody destylowanej wykazały wyraźnie niekorzystny wpływ niskiej temperatury na stężenia estryfikowanych epikatechin (galusanów: EGCG i ECG) niezależnie od czasu, szczególnie w wariantach z użyciem herbaty liściastej. Natomiast w przypadku nieestryfikowanych epikatechin, najwyższe stężenia związków odnotowano w napojach z herbaty liściastej po 12-godzinnej ekstrakcji w 20 °C oraz 6-godzinnej w 5 °C. W przypadku wariantu pierwszego wzrost stężeń EGC i EC względem próby referencyjnej był statystycznie istotny i wynosił odpowiednio 24% i 19%, co daje podstawę do przyjęcia hipotezy 1. W świetle przyjętych warunków eksperymentu, wariant ten uznano za najbardziej optymalny w maksymalizacji stężeń wszystkich epikatechin zielonej herbaty. Wariant ten sprzyjał również uzyskaniu wyższych stężeń witamin C, B2 i B3, a także charakteryzował się najwyższym potencjałem przeciwutleniającym.

Otrzymane w ramach publikacji 1 wyniki mają bardzo duży walor poznawczy i aplikacyjny. Prozdrowotny potencjał epikatechin zazwyczaj klasyfikowany jest w kolejności: EGCG > ECG > EGC > EC. Jednocześnie sugeruje się, że efektywność absorpcji jelitowej epikatechin maleje wraz ze wzrostem hydrofilowości i masy cząsteczkowej, co skutkuje odwrotną kolejnością bioprzyswajalności: EC > EGC > ECG > EGCG. **Zatem wskazanie warunków promujących ekstrakcję nieestryfikowanych epikatechin należy uznać, za istotne Osiągnięcie, ponieważ umożliwia uzyskanie napojów o wyższym potencjale prozdrowotnym.** Należy jednak zauważyć, że zastosowanie optymalnego wariantu ekstrakcji niskotemperaturowej prowadzi do obniżenia stosunków EGCG/EGC i ECG/EC w porównaniu z próbą referencyjną i może wpływać na słodszy smak napoju. Ma to istotne znaczenie z punktu widzenia konsumenta, dlatego w pracy brakuje oceny sensorycznej badanych ekstraktów.

Niedoskonałością pracy jest również brak analizy zawartości minerałów w użytej wodzie, co ogranicza możliwość pełnego zrozumienia zmian chemicznych zachodzących podczas ekstrakcji (wskazują na to zresztą sami Autorzy badań).

Publikacja 2

Celem pracy było zbadanie stabilności epikatechin podczas trawienia żołądkowo-jelitowego *in vitro* w naparze z zielonej herbaty (85 °C, 10 min.) i otrzymanej z na jego bazie kombuchy. Kombuchę przygotowano z udziałem kultury SCOBY, której skład został opracowany w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, a więc w macierzystej jednostce Doktoranta. Zawartość EGCG, ECG, EGC, EC i kofeiny w próbkach oznaczono ilościowo metodą HPLC przed i po ekspozycji na symulowane warunki trawienia. W próbkach analizowano również całkowitą zawartość polifenoli (TPC) i ich potencjał antyoksydacyjny z wykorzystaniem testu FRAP.

Otrzymane wyniki wykazały, że fermentacja naparu z zielonej herbaty spowodowała obniżenie, stężenia EGCG, ECG i EC odpowiednio o 12%, 13% i 9%, ale spowodowała wzrost zawartości EGC o 19%. Ostatecznie łączne stężenie epikatechin było niższe tylko o 5% w porównaniu z niefermentowanym naparem.

Symulowane trawienie żołądkowo-jelitowe doprowadziło do strat wszystkich epikatechin, jak również obniżenia się wskaźników FRAP i TPC w obu badanych napojach (niefermentowanym i fermentowanym). Jednak straty wszystkich epikatechin były statystycznie istotne jedynie w próbkach naparu ($p < 0,05$), a ich zawartość ogółem obniżyła się aż o 71 %. Kolejność odzysku była następująca: EC (82 %) > ECG (57 %) > EGC (52 %) > EGCG (3 %). W przypadku kombuchy, straty trawienne EC, EGC i ECG nie były statystycznie istotne ($p > 0,05$), a wskaźnik odzysku poszczególnych epikatechin wynosił odpowiednio: 95 %, 91 % i 72 %. Co ważne, stężenia EGCG, EGC, ECG i EC po trawieniu były odpowiednio 11,8-, 2,1-, 1,3- i 1,05-krotnie wyższe w porównaniu z niefermentowanym naparem. W rezultacie w kombuchy całkowite stężenie epikatechin po trawieniu było około dwukrotnie wyższe (i istotne statystycznie, $p < 0,05$), co jest podstawą do przyjęcia hipotezy 2. Wyniki badań wskazują również, że fermentacja zwiększa zawartość TPC i wzmacnia właściwości redukujące napoju, co może ograniczać autooksydację epigallokatechin w warunkach zasadowego pH układu trawienia *in vitro*.

Światło jelita cienkiego jest środowiskiem, które sprzyja wstępnej degradacji epikatechin wskutek autooksydacji, co ogranicza ich biodostępność i w efekcie bioaktywny potencjał, na co wskazują również niniejsze badania. O ile stabilność oksydacyjna epikatechin jest szeroko badana w niefermentowanych ekstraktach zielonej herbaty podczas trawienia w układach modelowych, to dotychczas nie przeprowadzono takich badań w matrycy kombuchy. **Publikacja 2 jest zatem pierwszym naukowym opracowaniem w tym obszarze i pośrednio pozwala lepiej zrozumieć wpływ procesów fermentacji na stabilność epikatechin w warunkach układu pokarmowego, a tym samym ich potencjalną biodostępność i skuteczność zdrowotną.**

Pomimo oczywistych walorów poznawczych publikacji 2, nie jest ona do końca spójna z publikacją 1. Nie uwzględniono w niej bowiem napojów otrzymanych na drodze niskotemperaturowych wariantów ekstrakcji, a zwłaszcza wskazanego za najbardziej optymalny w maksymalizacji stężeń wszystkich epikatechin (tj. 20 °C, 12 h, herbata liściasta), co wydaje się być logicznym tokiem kontynuacji badań. Proszę Doktoranta o wyjaśnienie w tej sprawie.

Proszę również o wyjaśnienie dlaczego hipotezę 2 zawężono tylko do EGC (bez EC, co byłoby spójne z hipotezą 1), gdyż przedstawiona geneza tej hipotezy nie przemawia do mnie. Tym bardziej, że

na str. 20, Doktorant wskazuje, że proces fermentacji z użyciem SCOBY może doprowadzić do zwiększenia zawartości obu nieestryfikowanych epikatechin.

Materiały niepublikowane (str. 43-48 rozprawy)

Zgodnie z deklaracją Doktoranta, celem tej części pracy była ocena wzrostu bakterii z gatunku *B. cereus* w warunkach niskotemperaturowej ekstrakcji wodnej zielonej herbaty. Jednak najpierw przedstawiono i omówiono w tym miejscu wyniki identyfikacji 6-ciu szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* (Tab. 4), które wyizolowano z napojów herbacianych otrzymanych metodą niskotemperaturowej ekstrakcji zielonej herbaty, jak również jej mieszanek z herbatą czarną (Tab. 1), o czym wspomniano wyżej. Następnie zaprezentowano wyniki dotyczące właściwego celu badania, które dotyczyły wzrostu komórek wegetatywnych dwóch szczepów *B. cereus* (izolatu AK1 oraz ŁOCK 0807 z Kolekcji Czystych Kultur Mikroorganizmów Przemysłowych Doktoranta) w ekstraktach dwóch rodzajów zielonej herbaty (Sencha B i Yunnan) przygotowanych z użyciem wody destylowanej w temperaturze 20°C przez 12 godzin. Na podstawie danych literaturowych przyjęto, że wzrost liczby komórek *B. cereus* w tych warunkach ekstrakcji stanowi potencjalny wskaźnik ryzyka mikrobiologicznego.

Otrzymane wyniki wyraźnie wskazały, że przyjęte warunki ekstrakcji nie sprzyjają wzrostowi obu szczepów *B. cereus*, co świadczy o potencjalnym bezpieczeństwie mikrobiologicznym tak przygotowanych napojów. Niezależnie od szczepu, stężenia inokulum oraz rodzaju herbaty, w okresie 1-12 godziny ekstrakcji zielonej herbaty, ich liczebność pozostawała na granicy wykrywalności, pozostając w zakresie 1,5-2,7 log jtk/ml, co pozwala na odrzucenie hipotezy 3.

Wyniki te dostarczają cennych informacji na temat ryzyka mikrobiologicznego związanego z niskotemperaturową produkcją napojów herbacianych i mogą stanowić podstawę do optymalizacji procesów produkcyjnych w celu minimalizacji zagrożeń zdrowotnych.

Pomimo niekwestionowanych walorów poznawczych, konsekwentnie podtrzymuję za bezzasadne włączenie do rozprawy badań dotyczących identyfikacji izolatów bakteryjnych i tym samym otrzymanych wyników.

3. PODSUMOWANIE

W ramach przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej zrealizowano szeroki zakres badań, opartych o prawidłowo dobrane i aktualne metody badawcze. Analizę statystyczną przeprowadzono poprawnie, a otrzymane wyniki zostały właściwie zinterpretowane. Wysoką wartość tych badań potwierdza publikacja większości wyników w renomowanych czasopismach z listy JCR oraz ich znacząca cytowalność, zwłaszcza w przypadku publikacji 1. Niemniej jednak cykl badań nie jest w pełni spójny, co wynika przede wszystkim z braku kompleksowego prześledzenia jednego, optymalnego wariantu ekstrakcji zielonej herbaty - zgodnego z rekomendacją publikacji 1 - pod kątem wpływu na:

- stabilność epikatechin w napoju (zarówno niefermentowanym, jak i fermentowanym),
- zachowanie tych związków podczas symulowanego trawienia oraz
- aspekt bezpieczeństwa mikrobiologicznego.

Zaproponowane wnioski są poprawne i odpowiadają na cel główny pracy, niemniej jednak konsekwentnie dotyczą dwóch różnych obszarów badawczych: stabilności epikatechin i oceny ryzyka rozwoju bakterii *B. cereus* w napojach zielonej herbaty pozyskiwanych na drodze ekstrakcji niskotemperaturowej.

Pomimo wskazanych uwag uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska potwierdza, że niskotemperaturowa ekstrakcja wodna zielonej herbaty (z udziałem wody destylowanej) w temperaturze 20 °C przez 12 godzin jest optymalnym wariantem, który pozwala poprawić funkcjonalność (maksymalizować ekstrakcję epikatechin i potencjał przeciwutleniający) i jednocześnie zachować bezpieczeństwo mikrobiologiczne napoju. Tym samym cel główny pracy został skutecznie osiągnięty.

Ponadto rozprawa wnosi istotny wkład poznawczy i aplikacyjny w zakresie optymalizacji procesów produkcyjnych napojów zielonej herbaty (ekstrakcja i fermentacja) w kierunku poprawy stabilności epikatechin oraz wzmocnienia ich potencjału przeciwutleniającego. Pozwala również lepiej zrozumieć wpływ procesu trawienia na stabilność tych związków, a tym samym ich potencjalną biodostępność i skuteczność zdrowotną.

Na uznanie zasługuje prawidłowy dobór i wykorzystanie licznych, aktualnych źródeł literaturowych (153 pozycje anglojęzyczne), a także rozległa, wieloaspektowa i dojrzała wiedza teoretyczna Doktoranta, która znalazła odzwierciedlenie w obszernej i wnikliwej dyskusji uzyskanych wyników badań.

Wszelkie wskazane w recenzji niedociągnięcia nie umniejszają wartości przedłożonego do recenzji materiału.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca spełnia wymogi formalne stawiane dysertacjom na stopień doktora.

4. WNIOSEK KOŃCOWY

Całość pracy oceniam pozytywnie i uważam, że spełnia ona wymóg oryginalnego rozwiązania problemu badawczego oraz wskazuje na bardzo szeroką wiedzę Kandydata w zakresie poruszanej tematyki badawczej. Na podstawie zakresu przeprowadzonych badań można również stwierdzić, że dobrze opanował warsztat badawczy i jest przygotowany do samodzielnej pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana Kamila Królaka pt. „Stabilność związków kształtujących potencjał funkcjonalny napojów zielonej herbaty” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia politechniki Łódzkiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Kamila Królaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podpisała

Prof. UPP dr hab. Barbara Stachowiak