

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Justyny Bochnak-Niedźwieckiej

pod tytułem

„Wartość odżywcza i właściwości prozdrowotne sproszkowanych napojów otrzymanych na bazie liofilizowanych warzyw i owoców”

Podstawa opracowania recenzji

Podstawą opracowania recenzji jest uchwała Rady Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 24.04.2019 roku oraz pismo z dnia 08.09.2022 roku, opatrzone sygnaturą RDT/os/2022, podpisane przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, prof. dr hab. Waldemara Gustawa.

Zawartość rozprawy doktorskiej i ocena formalna

Recenzowana rozprawa została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Świecy w Katedrze Biochemii i Chemii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Stanowi ona cykl czterech spójnych tematycznie oryginalnych prac twórczych o charakterze eksperymentalnym, opublikowanych w latach 2020-2022 w anglojęzycznych czasopismach naukowych:

- I. Bochnak-Niedźwiecka, J.; Świeca, M. Quality of new functional powdered beverages enriched with lyophilized fruits - potentially bioaccessible antioxidant properties, nutritional value, and consumer analysis. *Applied Sciences*, 2020, 10 (11), 3668.
- II. Bochnak-Niedźwiecka, J.; Szymanowska, U.; Świeca, M. Studies on the development of vegetable-based powdered beverages – Effect of the composition and dispersing temperature on potential bioaccessibility of main low-molecular antioxidants and antioxidant properties. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 2020, 131, 109822.

- III. Bochnak-Niedźwiecka, J.; Szymanowska, U.; Kapusta, I.; Świeca, M. Antioxidant content and antioxidant capacity of the protein-rich powdered beverages enriched with flax seeds gum. *Antioxidants*, 2022, 11, 582.
- IV. Bochnak-Niedźwiecka, J.; Szymanowska, U.; Świeca, M. The protein-rich powdered beverages stabilized with flax seeds gum - Antioxidant and antiproliferative properties of the potentially bioaccessible fraction. *Applied Science*, 2022, 12, 7159.

We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, natomiast w pracach numer (III) i (IV) również autorem korespondencyjnym (wraz z prof. Michałem Świecą i dr Urszulą Szymanowską). Na podstawie załączonych oświadczeń należy podkreślić duży wkład Doktorantki w powstanie omawianych publikacji. Obejmuje on współtworzenie hipotezy badawczej, metodologię, wykonanie specyficznych badań, przeprowadzenie doświadczeń, analizę wyników i przygotowanie manuskryptów artykułów. Procentowy udział Doktorantki w przygotowaniu publikacji jest wysoki i wynosi 65% - 80%. Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach naukowych z listy Journal Citation Reports (JCR), przy czym dwa czasopisma znajdują się w kwartylu Q1, a jedno w kwartylu Q2. Sumaryczny Impact Factor (IF) publikacji wynosi 18,144 a suma punktów MEiN 370. Przytoczone dane bibliometryczne wskazują na wysoką jakość merytoryczną rozprawy.

Przedłożony do recenzji manuskrypt składa się z dwóch zasadniczych części. Pierwsza z nich (obejmująca 51 stron) zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz omówienie treści publikacji wchodzących w skład rozprawy, z podziałem na wstęp, hipotezę i cel badań, materiały i metody, omówienie wyników i dyskusję oraz podsumowanie i wnioski. Ta część jest napisana w sposób logiczny, przystępny i syntetyczny, chociaż w kilku miejscach Doktorantka omawia uzyskane wyniki bez wskazania w której tabeli, lub na której rycinie można je znaleźć (np. zawartość polifenoli w napojach – str. 29 manuskryptu, analiza jakościowo-ilościowa frakcji fenolowej proszków – str. 37, zawartość przeciwutleniaczy niskocząsteczkowych w napojach – str. 38, zdolność do neutralizowania rodników hydroksylowych – str. 40, wartość siły redukcji – str. 40), co utrudnia czytanie rozprawy. Druga część opracowania zawiera kopie publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, wraz z oświadczeniami współautorów dotyczącymi ich wkładu w powstałe artykuły oraz podsumowanie dorobku naukowego Doktorantki.

Znaczenie tematyki badawczej podjętej w recenzowanej rozprawie

Szybki rozwój rynku żywności funkcjonalnej spowodowany jest, między innymi, rosnącymi wymaganiami konsumentów, związanymi z zainteresowaniem zdrowym stylem życia i zmianami codziennych nawyków. Stąd w krajach wysoko rozwiniętych obserwuje się wzrost popytu na żywność „wygodną”, w tym produkty do bezpośredniego spożycia (*ready-to-eat*) oraz o uproszczonym sposobie przygotowania (*ready-to-heat*). Z drugiej strony, ze względu na relatywnie niskie marże osiąmane przez przemysł spożywczy, producenci upatrują w rozwoju sektora żywności funkcjonalnej szansy na wzrost zysków. Najszybciej rozwijającym się obszarem rynku żywności specjalnego przeznaczenia żywieniowego jest produkcja

napojów. Nowym trendem na tym rynku jest produkcja napojów sproszkowanych, które cieszą się wysoką akceptacją ze strony konsumentów. Składniki pochodzenia roślinnego, w tym owoce i warzywa, ze względu na wysoką zawartość związków bioaktywnych, stanowią znakomity surowiec do produkcji funkcjonalnych napojów sproszkowanych. Produkcja tego typu żywności wymaga nie tylko wiedzy dotyczącej wartości odżywczej i zawartości związków bioaktywnych w surowcach, ale także ich wzajemnych interakcji, które wpływać mogą na postać fizyczną i strukturę produktu, biodostępność składników i akceptowalność konsumentką. Równie ważny jest odpowiedni dobór komponentów, w celu kształtowania właściwości antyoksydacyjnych czy przeciwnowotworowych. Autorka recenzowanej rozprawy opracowała receptury sproszkowanych napojów na bazie liofilizowanych kiełków soczewicy, marchwi i dyni, frakcji albumin/globulin z nasion soczewicy, z dodatkiem buraka, kiełków brokuła, natki pietruszki, malin, truskawek, jabłek i gumy lnianej. Otrzymane produkty zostały poddane szeregowi analiz, dotyczących między innymi zawartości wybranych substancji bioaktywnych, właściwości przeciwutleniających i przeciwnowotworowych, stabilności napojów, akceptowalności konsumentkiej, wartości odżywczej i biodostępności. Uważam, że tematyka badań prowadzonych przez Doktorantkę jest istotna z punktu widzenia rozwoju dyscypliny technologia żywności i żywienia, jak i potrzeb producentów żywności. Wyniki podjętych prac badawczych mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne, ponadto dotyczą aktualnej z punktu widzenia przemysłu spożywczego problematyki. Do najbardziej wartościowych i oryginalnych aspektów recenzowanej pracy zaliczam:

1. Kompleksowe podejście do analizowanego problemu, polegające na uwzględnieniu zagadnień biochemicznych, technologicznych i konsumentkich, w tym analizy właściwości prozdrowotnych napojów.
2. Przeprowadzenie eksperymentów dotyczących biodostępności związków biologicznie aktywnych obecnych w napojach, dzięki czemu wyniki badań *in vitro* dokładniej odzwierciedlają wpływ składników napojów na organizm człowieka.
3. Wykonanie oznaczeń właściwości przeciwnowotworowych (antyproliferacyjnych) związków biologicznie aktywnych obecnych w napojach, co jest stosunkowo rzadko uwzględniane podczas projektowania i analizowania właściwości żywności funkcjonalnej.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Tytuł recenzowanej rozprawy „Wartość odżywcza i właściwości prozdrowotne sproszkowanych napojów otrzymanych na bazie liofilizowanych warzyw i owoców” w pełni odzwierciedla tematykę przeprowadzonych badań.

Streszczenia w języku polskim i angielskim są napisane w sposób syntetyczny i komunikatywny. Ze względu na obszerność opracowania warto byłoby zamieścić wykaz stosowanych skrótów, co ułatwiłoby percepcję pracy.

We wstępie do rozprawy Doktorantka przybliży czytelnikowi podstawowe pojęcia związane z napojami funkcjonalnymi i zastosowaniem owoców i warzyw jako surowców do

ich produkcji oraz zwraca uwagę na konieczność uzupełnienia luki dotyczącej badania nie tylko wartości odżywczej sproszkowanych napojów funkcjonalnych, ale też ich właściwości prozdrowotnych, zwłaszcza w kontekście biodostępności składników aktywnych *in vitro*. Ta część rozprawy dobrze podsumowuje wiedzę dotyczącą podjętego tematu badań i jest oparta na aktualnym przeglądzie literatury przedmiotu.

Hipoteza badawcza i cel badań są precyzyjnie sformułowane i w pełni uzasadnione. Doktorantka opisała również szczegółowe cele badań na których realizacji oparta była weryfikacja hipotez badawczych.

Część metodyczna rozprawy obejmuje opis materiału badanego, stosowanych receptur napojów funkcjonalnych oraz metod analitycznych. Receptury napojów i schemat badań zostały przedstawione w postaci czytelnych rycin i schematów, co bardzo ułatwia percepcję tego rozdziału. Metody badań zostały właściwie dobrane i opisane w sposób wystarczający, z powołaniem się źródła literaturowe. Na pozytywną ocenę zasługuje różnorodność zastosowanych metod, co pozwoliło na scharakteryzowanie napojów pod kątem wartości odżywczej, zawartości i biodostępności składników biologicznie aktywnych, właściwości prozdrowotnych, właściwości fizykochemicznych i akceptowalności konsumenckiej. Obok standardowych metod, takich jak oznaczanie związków fenolowych z użyciem odczynnika Folin-Ciocalteu czy cukrów redukujących przy zastosowaniu kwasu dinitrosalicylowego, wykorzystano bardzo zaawansowane i stosunkowo rzadko używane w badaniach żywności procedury, takie jak np. analiza właściwości przeciwnowotworowych przy użyciu linii komórek nowotworowych: AGS - gruczolakorak żołądka (nr ECACC 89090402), HT 29 – gruczolakorak okrężnicy (ATCC HTB-38). Zastosowana metodyka należy z pewnością do silnych stron recenzowanej rozprawy. Niezależnie od pozytywnej oceny tej części pracy, prosiłbym Doktorantkę o uszczegółowienie kilku kwestii podczas publicznej obrony:

1. Czy znane są odmiany warzyw i owoców zastosowanych jako surowce do przygotowania napojów sproszkowanych? Odmiana, obok warunków uprawy, może np. wpływać na zawartość substancji bioaktywnych.
2. W oparciu o jakie kryteria dokonano wyboru dwóch najlepszych mieszanek (napojów) w III etapie badań?
3. Podczas badania właściwości przeciwnowotworowych (antyproliferacyjnych) ekstraktów zastosowano dwa stężenia, będące ekwiwalentem obecności 0,7% i 2,1 % napoju w medium. Według informacji zamieszczonej w metodyce stanowi to równoważnik ilości związków potencjalnie obecnych w komórkach po spożyciu 200 mL i 600 mL napoju. Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób ustalono (obliczono?) powyższe dawki? Czy uwzględniono w tym przypadku biodostępność (*ang. bioaccessibility*) oraz bioprzyswajalność (*ang. bioavailability*) obecnych w napojach związków? Czy Doktorantka opierała się na literaturowych danych eksperymentalnych czy na obliczeniach teoretycznych?
4. Czy analiza akceptowalności konsumenckiej napojów „zupo-podobnych”, rehydratowanych w temperaturze 80 °C odbywała się w temperaturze pokojowej czy wyższej?

W rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja” Doktorantka w sposób syntetyczny opisała uzyskane wyniki i przedyskutowała je w świetle aktualnej literatury przedmiotu. Szczegółowe omówienie rezultatów wraz z dyskusją wyników czytelnik może znaleźć z czterech załączonych publikacjach.

W publikacji (I) Doktorantka analizowała jakość napojów przygotowanych na bazie marchwi, dyni i kiełków soczewicy, z dodatkiem malin, truskawek i jabłek. Oznaczono zawartość niskocząsteczkowych przeciwutleniaczy, aktywność antyoksydacyjną i siłę redukcji, barwę, pH, wskaźnik rozpuszczalności w wodzie, wskaźnik absorpcji wody, zawartość skrobi, cukrów redukujących, białka, wolnych aminokwasów i peptydów. Omówiono również wyniki dotyczące strawności skrobi i białek *in vitro* oraz ocenę napojów przez panel sensoryczny. Zaprojektowane napoje charakteryzowały się wysoką zawartością antyoksydantów i biodostępnością składników. Wykazano również, że temperatura rehydratacji wpływa na akceptowalność konsumencką. Właściwości antyoksydacyjne napojów oraz potencjał redukcyjny były analizowane po chemicznej ekstrakcji składników oraz po procesie trawienia *in vitro*. Zaobserwowano wyraźny wzrost zdolności do neutralizowania rodników ABTS w wyniku trawienia, przy jednoczesnym obniżeniu wartości potencjału redukcyjnego. W przypadku napojów z dodatkiem buraka, kiełków brokuła i liści pietruszki (publikacja II) zaobserwowano natomiast istotny wzrost wartości potencjału redukcyjnego prób rehydratowanych w temperaturze 20 °C, przy jednoczesnym wzroście zdolności do neutralizowania rodników ABTS w wyniku trawienia. Zdolność do zmiatania wolnych rodników i potencjał redukcyjny stanowią dwa mechanizmy składające się na aktywność antyoksydacyjną produktu. W tym miejscu proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego trawienie powodujące wzrost zdolności neutralizowania rodników ABTS przez składniki napojów przyczyniało się jednocześnie do obniżenia potencjału redukcyjnego? Proszę również o komentarz dotyczący przyczyn różnicy we wpływie trawienia *in vitro* na potencjał redukcyjny w przypadku napojów analizowanych w publikacji (I) i (II).

Publikacja (II) dotyczy głównie charakterystyki przeciwutleniaczy niskocząsteczkowych, ich biodostępności i właściwości antyoksydacyjnych napojów opartych na marchwi, dyni i kiełkach soczewicy, z dodatkiem buraka, kiełków brokuła i liści pietruszki. Zastosowanie dodatków wpływało na smak, barwę i zapach analizowanych napojów, poprawiając ich ogólną akceptowalność. Wzbogacanie napojów powodowało również podwyższenie zawartości przeciwutleniaczy oraz potencjału antyrodnikowego i redukcyjnego. Stwierdzono także, że temperatura rehydratacji wpływa na dostępność i zawartość związków biologicznie aktywnych. Doktorantka analizowała względną biodostępność związków biologicznie aktywnych: polifenoli, karotenoidów i witaminy C. Zaobserwowano, że enzymy trawienne powodowały uwalnianie związków fenolowych z matrycy, co zostało potwierdzone przez stosunkowo wysokie wartości względnego współczynnika biodostępności. Natomiast w przypadku karotenoidów zanotowano istotne obniżenie stężenia, ze współczynnikami biodostępności poniżej jedności. Spadek zawartości karotenoidów w produktach jest według Autorki uzasadniony wrażliwością tej grupy związków na niskie pH zastosowane podczas trawienia pepsyną *in vitro* oraz podatnością na utlenianie. Dodatkowo ekstrahowalność

karotenoidów do fazy wodnej jest mocno ograniczona i zależna od obecności substancji lipofilnych w matrycy żywności. W przypadku napojów wzbogaconych preparatami białkowymi uzyskanymi z soczewicy i gumą lnianą (publikacja IV) zaobserwowano wyraźnie wyższą biodostępność karotenoidów (współczynnik biodostępności w zakresie 1,17 – 2,03). Doktorantka tłumaczy ten fakt wpływem związków fenolowych, polegającym na polepszeniu stopnia uwalniania karotenoidów z matrycy oraz ich aktywnością antyoksydacyjną. Autorka podkreśla, że takie zjawisko zaobserwowano w napojach bez dodatku gumy lnianej, opartych na białkach soczewicy, zawierających liofilizowaną pietruszkę i kiełki brokuła (P0V) oraz liofilizowane truskawki i maliny (P0F). Próba P0V, zawierająca 11,17 mg związków fenolowych/100 mL charakteryzowała się względnym współczynnikiem biodostępności REF 1,59; natomiast próba P0F zawierała 9,63 mg/100 mL polifenoli a REF wynosił 2,03. Tymczasem w przypadku napojów zawierających marchew, dynię i kiełki soczewicy z dodatkiem 10 % kiełków brokuła i pietruszki (publikacja II) całkowita zawartość związków fenolowych wynosiła 14,4 mg/100 mL i 12,3 mg/100 mL a współczynnik biodostępności karotenoidów odpowiednio 0,35 i 0,22 (temperatura rehydratacji 20 °C). Prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie dlaczego w napojach o zbliżonej zawartości związków fenolowych zaobserwowano tak duże różnice względnego współczynnika biodostępności karotenoidów.

W publikacji (III) recepturę napojów analizowanych w poprzednich pracach poddano istotnej modyfikacji. Kiełki soczewicy zostały zastąpione preparatem białkowym bogatym w albuminy i globuliny soczewicy a jako nowy dodatek funkcjonalny zastosowano gumę lnianą. Na uwagę zasługuje fakt, że oba dodatki były izolowane we własnym zakresie, według metodyki opisanej w rozprawie. Guma lniana polepszyła właściwości chelatujące produktu i zdolność do zmiatania wolnych rodników. Przydatnym uzupełnieniem pracy byłaby jakościowa i ilościowa charakterystyka składu tego surowca. W tym miejscu chciałbym także zapytać, czy zastąpienie w recepturze napoju kiełków soczewicy preparatem białkowym istotnie wpłynie na koszty jego wyprodukowania? Wadą napojów opartych na kiełkach soczewicy był niepożądany smak określany przez panel sensoryczny jako „fasolowy” i „mdły”. Zastąpienie kiełków preparatem białkowym mogło przyczynić się do poprawy cech organoleptycznych napojów. Szkoda że Doktorantka nie zdecydowała się przeprowadzenie oceny konsumenckiej produktów o tak zmodyfikowanej recepturze.

Publikacja (IV) charakteryzuje napoje sproszkowane wzbogacone w preparat białkowy otrzymany z soczewicy i gumę lnianą. Wprowadzenie gumy lnianej pozwoliło na uzyskanie napojów o wysokiej stabilności, co zostało potwierdzone przez pomiary gęstości optycznej. Zastąpienie kiełków soczewicy preparatem białkowym nie pogorszyło stabilności napoju i jego potencjału antyoksydacyjnego. Jednym z najciekawszych i najbardziej wartościowych elementów tej publikacji jest badanie potencjału przeciwnowotworowego napojów – testowano liofilizaty frakcji potencjalnie biodostępnych oraz czyste związki polifenolowe z nich wyizolowane. W badaniach wykorzystano dwie nowotworowe linie komórkowe. Największą aktywność wobec komórek AGS (gruczolakorak żołądka) stwierdzono dla liofilizowanej frakcji potencjalnie biodostępnej z napojów zawierających 15% dodatek gum lnianych oraz warzyw. Zastosowanie ekstraktu w wyższym badanym stężeniu pozwoliło na zmniejszenie

proliferaacji komórek o 92%. Wysoką aktywność antynowotworową wykazała również frakcja bogata w antocyjany z napojów na bazie kiełków soczewicy (proliferacja zmniejszona o 73%).

Niewątpliwie silną stroną recenzowanej rozprawy jest dyskusja wyników. Doktorantka wykorzystwała w niej szereg aktualnych pozycji literaturowych, porównując uzyskane rezultaty z wynikami prac innych autorów i wyjaśniając możliwe przyczyny obserwowanych zjawisk i zależności. Niektóre interpretacje mają wprawdzie charakter spekulacji, ale jest to naturalne w przypadku złożonych układów, jakimi są analizowane napoje sproszkowane.

Na podstawie uzyskanych wyników badań i ich dyskusji przedstawiono 13 wniosków, które są sformułowane prawidłowo i jednoznacznie wynikają z analizy rezultatów przeprowadzonych badań. W ostatnim akapicie podsumowania rozprawy Doktorantka weszła, moim zdaniem, w rolę recenzenta własnej pracy, pisząc: „Niewątpliwie osiągnięcie badań wchodzących w skład dysertacji stanowi baza wiedzy dotycząca projektowania oraz badania napojów sproszkowanych”. Muszę jednak przyznać, że zgadzam się z treścią cytowanego zdania.

Uwagi edytorskie i językowe

Rozprawa doktorska i publikacje wchodzące w jej skład napisane są jasnym, komunikatywnym językiem (zarówno w wersji polskiej, jak i angielskiej) oraz starannie pod względem edytorskim. W manuskrypcie pojawiły się jednak drobne błędy językowe, literówki oraz nieprawidłowości związane z nomenklaturą substancji chemicznych lub tłumaczeniem z języka angielskiego (np. „kwas tłuszczowy omega-3” zamiast „n-3” – str. 7,10; „ideologia żywności” zamiast „idea żywności” – str. 10; „kolor” zamiast „barwa” – str. 24, 33, 34, 36, 50; „figura” zamiast „rycina” – str. 32, 41, 43; „warzywa i owce” zamiast „warzywa i owoce” – str. 11; używanie zamiennie dwóch wersji nazwy flawonoidu „kaempferol” i „kaemferol” – str. 37). Błędy te, wymienione przez mnie jedynie z obowiązku recenzenta, nie wpływają na merytoryczną jakość rozprawy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest dobrze zaplanowana i stanowi spójny tematycznie zbiór czterech publikacji naukowych. Tematyka pracy mieści się w zakresie dyscypliny technologia żywności i żywienia. Realizacja rozprawy z pewnością wymagała od Doktorantki dużej wiedzy merytorycznej, znakomicie opanowanego warsztatu badawczego i dobrej organizacji pracy. Realizowane eksperymenty obejmowały zarówno opracowanie receptur napojów sproszkowanych, ich wytworzenie, jak i zbadanie całego szeregu właściwości fizykochemicznych, biologicznych i organoleptycznych. Recenzowana praca doktorska jest dziełem oryginalnym i stanowi istotny wkład w poszerzenie stanu wiedzy dotyczącej wytwarzania i właściwości napojów funkcjonalnych. Rozprawa bez wątpienia ma również dużą wartość aplikacyjną. Zdobyta wiedza powinna znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Justyny Bochnak-Niedźwieckiej pt. „Wartość odżywcza i właściwości prozdrowotne sproszkowanych napojów otrzymanych na bazie liofilizowanych warzyw i owoców” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789, z późn. zm.). Na podstawie przedstawionej powyżej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej wnioskuję do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr inż. Justyny Bochnak-Niedźwieckiej do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.



prof. UPP dr hab. Krzysztof Dwiecki