

Warszawa 13.04.2023.

dr hab. Renata Kazimierczak, prof. SGGW
Katedra Żywności Funkcjonalnej i Ekologicznej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Nowosad

**„Wpływ elektroporacji na akumulację jonów żelaza w komórkach
drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”**

promotor pracy: dr hab. Monika Sujka, prof. uczelni

Praca została wykonana na Wydziale Nauk o Żywności
i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

**Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

**Instytut Nauk
o Żywieniu Człowieka**

ul. Nowoursynowska 159 C
02-776 Warszawa
+48 22 59 370 10
inzc@sggw.edu.pl
www.sggw.pl

Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji:

*Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu przyrodniczego w
Lublinie z dnia 12.10.2022 r.*

*Podstawę prawną stanowi Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o
szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn.
zmianami).*

Celowość podjęcia tematu

Wyeliminowanie z diet roślinnych produktów pochodzenia zwierzęcego powoduje zwiększenie ryzyka wystąpienia niedoborów żywieniowych, a zwłaszcza niedoborów witaminy B₁₂ i żelaza. W przypadku niedoboru żelaza suplementacja doustna wiąże się często z działaniami niepożądanymi ze strony układu pokarmowego i niską przyswajalnością tego pierwiastka. Wzbogacanie żywności żelazem ma również pewne ograniczenia, do których należy m.in. zmiana smaku i barwy żywności oraz powodowanie utleniania tłuszczu. Zastosowanie metod akumulacji minerałów i witamin w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

może być sposobem pozwalającym na uniknięcie tego typu niekorzystnych zmian. Dzięki poddaniu komórek drożdży działaniu pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF), które zaburza integralność błony komórkowej, możliwe jest zwiększenie jej przepuszczalności, a tym samym przedostawanie się cząsteczek do cytoplazmy komórki prowadzące do zwiększenia akumulacji składników mineralnych i witamin w komórkach drożdży. Wzbogacenie drożdży w żelazo i witaminę B₁₂ mogłoby więc stanowić dodatkowe źródło tych składników w diecie. Jak dotąd niewielka jest ilość prac naukowych na ten temat, dlatego podjęta w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej tematyka badawcza jest niezmiernie istotna ze względu na zdrowie człowieka, jego dobre samopoczucie i prawidłowe funkcjonowanie organizmu. W czasach zainteresowania nowymi technologiami pozwalającymi na rozwiązywanie ważnych problemów związanych z żywieniem, badania nad wykorzystaniem drożdży wzbogaconych w jony żelaza i witaminę B₁₂ mają potencjalnie duże znaczenie poznawcze i praktyczne.

Ocena formalna pracy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Wpływ elektroporacji na akumulację jonów żelaza w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” stanowi spójny tematycznie cykl czterech publikacji, w tym trzech oryginalnych prac twórczych i jednej pracy przeglądowej, opublikowanych w latach 2021-2022 w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym posiadających indeks wpływu IF i znajdujących się w części A wykazu czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN). Są to następujące pozycje:

1. **Nowosad, K.**, Sujka, M., Pankiewicz, U., Kowalski, R. (2021). The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *Journal of Food Science and Technology*, 58(2), 397-411. (70 punktów MEiN, IF 3,117)
2. **Nowosad, K.**, Sujka, M., Pankiewicz, U., Miklavčič, D., Arczewska, M. (2021). Pulsed electric field (PEF) enhances iron uptake by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomolecules*, 11(6), 850. (100 punktów MEiN, IF 6,064)
3. **Nowosad, K.**, Sujka, M. (2021). The use of iron-enriched yeast for the production of flatbread. *Molecules*, 26(17), 5204. (140 punktów MEiN, IF 4,927)
4. **Nowosad, K.**, Sujka M., Wrostek J. (2022). Preparation of yeast flakes enriched with iron and vitamin B12 using a pulsed electric field technology. *Journal of Food Process Engineering*, e14245. (100 punktów MEiN, IF 2,889).

Suma punktów MEiN za wymienione publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, według komunikatu MEiN obowiązującego w roku wydania pracy wynosi 410, a ich sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 16,997. Liczba cytowań (bez autocytowań) wg Scopus na dzień 03.02.2023 r. wyniósł 47.

Przedłożona do recenzji dysertacja składa się z 10 rozdziałów, zawierając oprócz kopii opublikowanych prac 56 stronicowy maszynopis. Układ pracy jest typowy dla opracowań o charakterze eksperymentalnym. Obejmuje część teoretyczną zawierającą: **Streszczenie pracy** w języku polskim i angielskim, Wstęp, będący **uzasadnieniem wyboru tematu pracy**, w którym zostały opisane podstawy teoretyczne i przedstawiona w ramach rozprawy tematyka badawcza, **Cel i zakres pracy oraz hipotezy badawcze**, a także część doświadczalną, którą charakteryzuje szczegółowy opis **materiału i metod badawczych** z bardzo praktycznymi elementami jakimi są schematy graficzne ułatwiające swobodne poruszanie się w obrębie tego rozdziału. Następnie praca zwiera **Prezentację wybranych wyników badań** połączoną z dyskusją w świetle najnowszej literatury światowej, **Podsumowanie i wnioski** oraz **Bibliografię** obejmującą 61 pozycji, a także **Oświadczenia współautorów** o udziale w opracowaniu publikacji oraz **Zestawienie dorobku naukowego i Załączniki** (publikacje wchodzące w skład osiągnięcia). Z oświadczeń współautorów publikacji nie wynika jaki był procentowy udział Doktorantki w ich powstaniu. Z informacji znajdujących się w artykułach wynika, że Doktorantka brała udział w tworzeniu koncepcji badań, doborze właściwych metod do realizacji celu badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu wyników i ich interpretacji, przygotowywaniu i redagowaniu manuskryptów oraz odpowiedzi na recenzje. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Świadczy to o opanowaniu przez mgr inż. Karolinę Nowosad umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, w tym prowadzenia analiz i interpretacji wyników badań, a także ich prezentowania.

Podsumowując, stwierdzam że pod względem formalnym praca spełnia wymogi stawiane pracy doktorskiej.

Merytoryczna ocena pracy

Tytuł rozprawy jest zgodny z jej treścią.

W rozdziale pierwszym Doktorantka zawarła wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, uwzględniając sumę punktów za te publikacje wg listy MEiN oraz sumaryczny Impact Factor wg listy JCR i liczbę cytowań wg Scopus.

Rozdział drugi stanowi ponad 3-stronicowe uzasadnienie wyboru tematu rozprawy, prezentujące aktualny stan wiedzy na temat akumulacji jonów metali i witamin w komórkach drożdży pod wpływem pulsacyjnego pola elektrycznego. Ta część pracy napisana jest bardzo zwięźle i rzeczowo, w oparciu

o właściwie dobrane piśmiennictwo, co świadczy o zorientowaniu Autorki w literaturze przedmiotu. Tym samym podjęty przez Doktorantkę temat badawczy uważam za trafny.

W rozdziale trzecim Autorka przedstawiła wybrany do rozwiązania problem naukowy, którym było zastosowanie pola elektrycznego do wzbogacania komórek drożdży w jony żelaza w celu wykorzystania ich do produkcji żywności funkcjonalnej, wskazując jako cel pracy ocenę wpływu parametrów pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację jonów żelaza w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Autorka jasno sformułowała pięć hipotez badawczych, zakładających, że zastosowanie pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) powoduje wzrost zawartości jonów żelaza w komórkach drożdży (Hipoteza 1), a optymalizacja poszczególnych parametrów PEF może przyczynić się do zwiększenia tej zawartości (Hipoteza 2). Jednocześnie zastosowane metody nie wpłyną na żywotność i przyrost biomasy drożdży (Hipoteza 3) oraz ich aktywność fermentacyjną (Hipoteza 4). Ostatnia hipoteza (Hipoteza 5) zakładała, że wzbogacone w jony żelaza drożdże będą mogły być wykorzystane do produkcji żywności przeznaczonej dla osób zagrożonych niedoborem tego pierwiastka w diecie.

Uwagi, jakie mi się nasunęły w trakcie zapoznawania się z celami i hipotezami rozprawy doktorskiej:

1. W opisie problemu badawczego Doktorantka ujęła problem zastosowania pulsacyjnego pola elektrycznego do wzbogacania komórek drożdży jonami żelaza w celu wykorzystania ich do produkcji żywności funkcjonalnej, nie uwzględniając wzbogacania drożdży w witaminę B₁₂, co zostało przeprowadzone i opublikowane w ramach niniejszej rozprawy. W związku z tym proponuję uzupełnić opis problemu badawczego i przedstawić uzupełniony w czasie publicznej obrony.

2. Doktorantka wyszczególniła w pracy 5 hipotez badawczych, w których nie uwzględniła konsekwentnie hipotezy związanej ze wzbogacaniem komórek drożdży w witaminę B₁₂, dlatego zasadne wydaje mi się uzupełnienie hipotez w tym zakresie.

W rozdziale czwartym Materiał i metody Doktorantka scharakteryzowała i opisała bardzo szczegółowo zastosowane metody badań. Wszystkie narzędzia badawcze zostały bardzo dobrze dobrane do prowadzonych badań. Wybrano najnowsze metody analityczne, chemiczne, fizyczne i sensoryczne. Warto podkreślić, że Doktorantka prowadziła swoje badania wykorzystując nowoczesne techniki analityczne, jak wysokosprawną chromatografię cieczową, atomową spektrometrię absorcyjną czy trawienie *in vitro*. Dowodzi to, że Pani Magister posiada duże

umiejętności analityczne i ma dobrze opanowany warsztat badawczy, niezbędny do prowadzenia badań w obszarze związanym z technologią żywności i żywienia.

W rozdziale Prezentacja wybranych wyników badań Autorka przedstawiła wyniki zawarte w poszczególnych publikacjach oraz przeprowadziła ich dyskusję. Wyniki zostały zaprezentowane na 13 rycinach oraz w 6 tabelach w sposób bardzo czytelny, a treść rozdziału została podzielona na sześć części: 1) *Wybór soli żelaza oraz optymalnego stężenia jonów żelaza*, 2) *Optymalizacja parametrów PEF i jej wpływ na akumulację jonów żelaza w komórkach drożdży*, 3) *Ocena zmian biomasy i przeżywalności drożdży po działaniu PEF*, 4) *Ocena wpływu PEF na akumulację jonów żelaza w strukturach komórkowych drożdży metodą mikroskopii fluorescencyjnej oraz ATR-FTIR*, 5) *Analiza właściwości fermentacyjnych drożdży wzbogaconych w jony żelaza* i 6) *Wybrane właściwości podplomyków z dodatkiem drożdży wzbogaconych jonami żelaza za pomocą PEF*.

Warto podkreślić, że pomimo, iż suplementacja żelaza była przedmiotem zainteresowania ośrodków naukowych od wielu lat, to jednak wykorzystane przez Doktorantkę podejście, oparte na znanym mechanizmie działania pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) połączone z wyborem odpowiedniej soli żelaza, dla której zanotowano największą akumulację tego pierwiastka w drożdżach, okazało się bardzo obiecujące z punktu widzenia potencjału aplikacyjnego. W kolejnych etapach badań optymalizowano stężenie jonów żelaza w pożywce, uzyskując parametry pulsacyjnego pola elektrycznego (napięcie, szerokość pulsu, temperatura i czas trwania procesu) zapewniające największą ich akumulację w komórkach drożdży i jednocześnie brak wobec nich efektu toksycznego. Pomiar przeprowadzone przez Doktorantkę z wykorzystaniem metody mikroskopii fluorescencyjnej oraz ATR-FTIR pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmu przejścia jonów żelaza przez ścianę komórkową i przestrzeń peryplazmatyczną drożdży, który w dużym stopniu jest wynikiem działania PEF. W zakresie badań nad zmianami biomasy i przeżywalności drożdży pod wpływem PEF Autorka wykazała jedynie niewielkie różnice w liczbie martwych komórek i produkcji biomasy w zależności od badanych wartości napięcia i czasu jego działania oraz nieco większe w zależności od szerokości pulsu. Kolejnym etapem badań była analiza właściwości fermentacyjnych drożdży wzbogaconych w jony żelaza w warunkach PEF, w której Doktorantka wykazała niższą ich wydajność w porównaniu do prób kontrolnych, tłumaczoną szkodliwością żelaza dla komórek oraz częściowo niższą zawartością białka i dostępnością

przyswajalnego azotu. Wyniki i wnioski przedstawione w publikacjach 1 i 2 prowadzą do stwierdzenia, iż metoda pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) jest bardzo obiecującą metodą do wykorzystania w produkcji żywności funkcjonalnej. Z uwagi na fakt, że wiele suplementów i produktów bogatych w żelazo ma niską biodostępność tego pierwiastka, Autorka w ramach publikacji 3 podjęła się próby oceny produktów (podpłomyków) wypiekanych z użyciem drożdży wzbogaconych w żelazo pod względem potencjalnej biodostępności żelaza, jego indeksu glikemicznego i aktywności przeciwutleniającej oraz cech sensorycznych. Uzyskane wyniki wykazały, że pieczywo z dodatkiem drożdży wzbogaconych jonami żelaza w warunkach PEF zawierało mniej węglowodanów i miało niższą wartość kaloryczną, przy porównywalnym indeksie glikemicznym i braku znaczących różnic w aktywności przeciwutleniającej, a jednocześnie zawierało znacznie więcej żelaza o większej potencjalnej biodostępności w porównaniu do pieczywa niewzbogaconego. Badanie sensoryczne potwierdziło, że produkt ten jest również akceptowalny dla konsumentów, uzyskując istotnie lepsze noty w zakresie zapachu, smaku i oceny ogólnej. Kolejna publikacja dotyczyła innego produktu, którym były płatki drożdżowe otrzymane z drożdży wzbogaconych w jony żelaza z użyciem PEF, do których dodatkowo wprowadzono witaminę B₁₂. Po uprzedniej optymalizacji akumulacji witaminy B₁₂ w komórkach drożdży, przeprowadzając podobną analizę wartości odżywczej i sensorycznej oraz potencjalnej biodostępności jak w przypadku podpłomyków, Doktorantka uzyskała obiecujące wyniki. Wykazano bowiem, że płatki drożdżowe wzbogacone w żelazo i witaminę B₁₂ pod wpływem PEF zawierały najwięcej żelaza i witaminy B₁₂ o największej biodostępności w porównaniu z próbami kontrolnymi. Podobnie jak w przypadku podpłomyków, obecność żelaza nie zmieniała właściwości sensorycznych produktu. Nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie struktury, konsystencji i smaku badanych płatków. W związku z uzyskanymi wynikami, produkty wytworzone z dodatkiem drożdży wzbogaconych jonami żelaza i witaminy B₁₂ w warunkach PEF, mogą być traktowane jako alternatywa dla suplementów diety w stanach niedoboru tych składników zwłaszcza dla wegan i wegetarian.

Pytanie, jakie mi się nasunęło w trakcie zapoznawania się z wynikami uzyskanymi w ramach rozprawy doktorskiej: Czy Doktorantka widzi możliwości i kierunki zastosowania metody PEF do tworzenia innych produktów funkcjonalnych, jakiej żywności mogłyby dotyczyć?



Kolejną część pracy stanowi rozdział Podsumowanie i wnioski, w którym Doktorantka sformułowała wniosek podsumowujący całokształt realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej badań i pięć wniosków wynikających z uzyskanych w trakcie badań danych. W rozdziale tym Autorka nie odniosła się bezpośrednio do poszczególnych hipotez badawczych pracy, choć jednocześnie można stwierdzić, że sformułowane wnioski 1, 2, 3 i 5 stanowią potwierdzenie hipotez 1, 2, 3 i 5. Natomiast wniosek 4 (Aktywność fermentacyjna drożdży wzbogaconych w jony żelaza bez udziału PEF, jak i z zastosowaniem PEF jest niższa niż drożdży niewzbogaconych) według mnie nie potwierdza hipotezy 4 pracy. W związku z tym zasadne wydaje się doprecyzowanie tego na początku rozdziału Podsumowanie i wnioski, gdzie Doktorantka pisze: „Postawione na wstępie hipotezy badawcze zweryfikowano przeprowadzając szereg eksperymentów na drożdżach wzbogaconych w jony żelaza za pomocą pulsacyjnego pola elektrycznego”.

Bibliografia stanowiąca rozdział 7 rozprawy doktorskiej zawiera 61 pozycji, w znakomitej większości anglojęzycznych i w ponad połowie pochodzących z ostatnich 10 lat. Bibliografia jest przygotowana bardzo starannie, z dużą troską o szczegóły. Wszystkie nazwy czasopism podane zostały według tego samego klucza. Nie znalazłam żadnych uchybień w tym rozdziale.

Podsumowując, pomimo wskazanych drobnych uwag uważam, że praca doktorska Pani mgr inż. Karoliny Nowosad została przygotowana bardzo starannie, z dużą dbałością o stronę naukową, językową i wizualną. Układ publikacyjny i monotematyczny artykułów wchodzących w skład rozprawy, obejmujący wyniki otrzymane w cyklu badań, pozwoliły na potwierdzenie, że drożdże wzbogacane w żelazo i witaminę B₁₂ przy użyciu pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) mogłyby być wartościowym surowcem do produkcji jednocześnie funkcjonalnych i atrakcyjnych sensorycznie produktów, a zaprezentowana w pracy metoda wydaje się bardzo obiecująca i godna dalszego rozwijania i upowszechniania.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **mgr inż. Karoliny Nowosad, pt. „Wpływ elektroporacji na akumulację jonów żelaza w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”** ma bardzo wysoką wartość naukową, a także duży potencjał aplikacyjny. Dotyczy ważnej i aktualnej tematyki badawczej, wnosi nowe elementy, informacje i spostrzeżenia,



a przedstawione przez mnie bardzo drobne i nieliczne uwagi, nie umniejszają jej merytorycznej wartości poznawczej oraz znaczenia podjętego problemu badawczego.

Uważam, że oceniana dysertacja spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawartym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami). Doktorantka wykazała wysoką umiejętność prowadzenia badań naukowych, a także opracowania i interpretacji, jak też dyskusji otrzymanych wyników w oparciu o aktualne piśmiennictwo z zakresu podjętej problematyki badawczej. Wnioskuje zatem do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie **Pani mgr inż. Karoliny Nowosad** do publicznej obrony oraz dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy, wynikającą z dużego zakresu analiz, niezwykle poprawnego posługiwania się narzędziami badawczymi, uzyskania wartościowych wyników oraz umiejętnej ich interpretacji, jak też poprawności napisania dysertacji naukowej oraz opublikowania otrzymanych wyników w czasopiśmie o wysokiej punktacji i posiadających indeks wpływu IF, proponuję wyróżnienie przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej stanowiącej podstawę postępowania doktorskiego Pani mgr inż. Karoliny Nowosad.

Reneta Kaimierczak