



Politechnika Łódzka

Katedra Cukrownictwa i Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności

prof. dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

Łódź, 20.03.2023

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Nowosad

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

wykonanej

na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Promotor: dr hab. Monika Sujka, prof. uczelni

Podstawa formalna

Ocenę, której przedmiotem jest rozprawa doktorska nt. „Wpływ elektroporacji na akumulację jonów żelaza w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” wykonałam na zlecenie Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 8.02.2023 r., która powierzyła mi recenzję rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Nowosad wyznaczając na recenzenta uchwałą z dnia 12.10.2022 r. w przewodzie doktorskim w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia na podstawie Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami).

Ocena formalna pracy

Praca doktorska mgr inż. Karoliny Nowosad obejmuje 57 stron numerowanych, w tym 46 stron to prezentacja wyników badań w języku polskim wraz ze zwięzłym komentarzem i zestawieniem piśmiennictwa. Na kolejnych 4 stronach zamieszczono oświadczenia współautorów o udziale w przygotowaniu publikacji, po których następuje zestawienie

1

dorobku naukowego Doktorantki (5 stron) oraz zestawienie wskaźników bibliometrycznych dorobku naukowego (2 strony). Cztery publikacje, w języku angielskim, stanowiące rozprawę doktorską zostały zamieszczone na 57 nienumerowanych stronach. W rozprawie, oprócz spisu treści oraz streszczeń w języku polskim i języku angielskim, wydzielono 10 następujących rozdziałów: *Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej*, *Uzasadnienie wyboru tematu pracy doktorskiej*, *Cel i zakres pracy doktorskiej oraz hipotezy badawcze*, *Materiał i metody badawcze*, *Prezentacja wybranych wyników badań*, *Podsumowanie i wnioski*, *Bibliografia*, *Oświadczenia o procentowym udziale autorów w opracowaniu publikacji*, *Zestawienie dorobku naukowego*, *Załączniki*. W tekście rozprawy doktorskiej zawarty jest homogenny tematycznie zbiór artykułów, poprzedzony zwięzłym i przejrzystym omówieniem kolejnych etapów badań wraz z odniesieniami do poszczególnych publikacji naukowych. Przedstawione omówienie stanowi dobry przewodnik, umożliwiający recenzentowi podążanie wraz z Autorką ścieżką badawczą w rozwiązywaniu zdefiniowanego problemu naukowego. O ile nie mam uwag co do miejsca zamieszczenia prezentacji dorobku naukowego Pani mgr Karoliny Nowosad, to rozdział zawierający oświadczenia współautorów moim zdaniem warto ulokować bezpośrednio po publikacjach, co ułatwiłoby ocenę wkładu Doktorantki w tę kluczową część rozprawy. Dokumentacja zawarta w komentarzu do zestawu publikacji składających się na rozprawę doktorską obejmuje 6 tabel oraz 18 rysunków, w tym 12 wykresów, 5 grafik i jedną fotografię. Przewaga graficznej formy prezentacji wyników w porównaniu liczbą tabel znacząco ułatwia zrozumienie przeprowadzonej przez Doktorantkę analizy rezultatów badań oraz wybór sposobu dalszego postępowania. Komentarz do publikacji napisany jest poprawnym językiem, przejrzysto i logicznie rysując przebieg badań oraz motywy decyzji podejmowanych na poszczególnych etapach badawczych. Rozdział *Prezentacja wybranych wyników badań* został rozbudowany do siedmiu sekcji, stanowiących opis kolejnych, konsekwentnie realizowanych etapów pracy i jest wiernym przekazem treści publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Część stanowiąca *Podsumowanie i wnioski* to jednostronicowa, zwięzła prezentacja konkluzji pracy wraz z pięcioma szczegółowymi wnioskami. W rozdziale *Załączniki* zawarto jednostronicowe zestawienie wyników cytowań prac Pani mgr Karoliny Nowosad indeksowanych w bazach Web of Science Core Collection - Basic Search i Scopus - Author Search oraz cztery publikacje naukowe wchodzące w skład rozprawy. W mojej opinii, zestawienie cytowań warto byłoby formalnie włączyć do rozdziału *Zestawienie dorobku naukowego*, pozostawiając wydzielone publikacje. Skromności Autorki rozprawy przypisuję umieszczenie publikacji, które są dowodem wartości naukowej prowadzonych prac, w rozdziale sygnowanym *Załączniki*, a nie np. „Publikacje”.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została oparta na homogennym zbiorze czterech powiązanych tematycznie artykułów (PI-PIV) opublikowanych w czasopiśmie

znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku wpływu *Impact factor* równym 16,997 (zgodnie z rokiem opublikowania):

- **PI:** 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.
- **PII:** 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.
- **PIII:** Nowosad K., Sujka M. 2021. The use of iron-enriched yeast for the production of flatbread. *Molecules* 26(17), 5204.
- **PIV:** Nowosad K., Sujka M., Wyrstek J. (2022). Preparation of yeast flakes enriched with iron and vitamin B12 using a pulsed electric field technology. *Journal of Food Process Engineering*, e14245.

Według Scalonego wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów (*załącznik do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 21 grudnia 2021 r.*) dyscyplina technologia żywności i żywienia jest dyscypliną naukową przypisaną do tych czasopism, a sumaryczna ocena parametryczna czasopism wynosi 410 punktów. Publikacje pochodzą z ostatnich dwóch lat: trzy z roku 2021 (PI, PII, PIII) i jedna z roku 2022 (PIV). Wszystkie publikacje są wieloautorskie, sygnowane przez 2 do 5 współautorów. Podkreślam, że Pani mgr Karolina Nowosad jest pierwszą autorką we wszystkich publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Doktorantka deklaruje udział w opracowaniu koncepcji badań i koncepcji publikacji, wykonanie większości badań laboratoryjnych, opracowanie i interpretację wyników, przygotowanie i redagowanie manuskryptu (publikacje PI-PIV) oraz odpowiedzi na recenzje (publikacje PIII i PIV). Pomimo braku deklaracji procentowego udziału, wskazanie tak szerokiego i wielokierunkowego zakresu działań świadczy o niewątpliwie dużym zaangażowaniu oraz wiodącej roli Pani mgr Karoliny Nowosad w formułowaniu koncepcji badań, ich realizacji, a także w procesie publikacyjnym. Opublikowanie rezultatów pracy badawczej w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku wpływu *Impact factor* dowodzi wysokiej wartości naukowej oraz aktualności tematyki prac objętych rozprawą doktorską.

Bibliografia zamieszczona w części komentarza do publikacji obejmuje 61 pozycje datowanych na lata 1984-2022. Przeważają pozycje z lat 2010-2022, stanowiące 52% cytowanej literatury (32 pozycje), a 13% to klasyczne dla poruszanej tematyki badawczej pozycje z lat 1984-1998 (8 pozycji). Najnowsza literatura z lat 2020-2022 stanowi 16% bibliografii (10 pozycji). Zestawienie to świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu, szczególnie dotyczącej badań na przestrzeni ostatniej dekady oraz właściwym

jej doborze. Mam niewielkie uwagi dotyczące formatowania bibliografii tj. zastosowania kursywy w nazwach łacińskich drobnoustrojów, czy zapisu techniki *in vitro* (np. pozycja 11, 27, 32, 36, 37, 40, 41, 51, 61) oraz sposobu zapisu tytułów publikacji (np. pozycja 33 i 35). Warto podkreślić również rozmiar bibliografii zamieszczonej w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Każda z publikacji opatrzona jest obszernymi spisami literatury, które słusznie posłużyły do wyboru bibliografii komentarza. Już rozmiar piśmiennictwa publikacji PI (139 pozycji), dotyczącej przeglądu literatury w obszarze zastosowania pulsacyjnego pola elektrycznego w przetwarzaniu żywności, wskazuje na dogłębne studia literaturowe i doskonałą znajomość zagadnienia przez Doktorantkę. Kolejne publikacje oparte na pracach eksperymentalnych zawierają 57 (publikacja PII), 46 (publikacja PIII) i 68 pozycji (publikacja PIV).

Ocena merytoryczna pracy

Powszechna świadomość wpływu sposobu odżywiania na zdrowie człowieka skutkuje poszukiwaniem najbardziej optymalnych diet, stanowiących często kompromis pomiędzy zapotrzebowaniem organizmu na poszczególne składniki, uwarunkowaniami ekonomicznymi i aktualnymi trendami. Lansowane w ostatnich latach wegetarianizm, weganizm, freeganizm, fleksitarianizm, dieta wykluczająca gluten i laktozę, comfort food, mood food, mindful eating, less waste czy zero waste to tylko niektóre ze sposobów odżywiania, często połączone z określonym stylem życia. Pojawiające się okresowe modne trendy żywieniowe, wprowadzające różne diety, niosą niebezpieczeństwo niedoboru niezbędnych mikroelementów i witamin, w tym również żelaza i witaminy B₁₂. Oprócz niedokrwistości (anemii), powszechnie kojarzonej z niedoborami żelaza w organizmie człowieka, brak tego pierwiastka wiązany jest z chorobami cywilizacyjnymi t. jak choroby układu krążenia oraz nowotwory. Symptomami niedoboru żelaza może być między innymi ospałość, apatia, ogólne zmęczenie, bóle i zwroty głowy czy osłabienie odporności i zwiększenie podatności na infekcje. Podjęta w pracy tematyka fortyfikacji żywności w celu wzbogacenia diety w związku żelaza i witaminę B₁₂ jest aktualna i wpisuje się w obecne trendy i potrzeby żywieniowe. Fortyfikacja żywności związkami żelaza obarczona jest zwykle niekorzystnymi zmianami organoleptycznymi, a wprowadzanie tego pierwiastka poprzez mikrokapsułkowanie w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest rozwiązaniem ciekawym i możliwym do realizacji również w skali przemysłowej. Ponadto, dodatkową korzyścią dla konsumenta może być potencjalne tworzenie metaloprotein w komórkach mikroorganizmu, co zwiększałoby przyswajalność żelaza przez organizm człowieka. Propozycja zastosowania pulsacyjnego pola elektrycznego do zwiększania akumulacji żelaza w komórkach drożdży oraz pogłębione badania nad formą jego akumulacji, w mojej opinii, stanowi równocześnie połączenie nowoczesnego podejścia aplikacyjnego oraz

aspektu naukowego przyczyniającego się do poszerzenia wiedzy w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Problem naukowy postawiony w pracy doktorskiej został sformułowany jasno, wskazując na możliwość zastosowania pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) jako efektywnej metody wzbogacania komórek drożdży w jony żelaza, z zachowaniem ich żywotności i aktywności fermentacyjnej. Pozyskane w tej technologii drożdże mogłyby stanowić nie tylko suplement diety bogaty w żelazo i witaminę B₁₂, ale również organizm użyteczny biotechnologicznie. W celu pracy Pani mgr Karolina Nowosad precyzuje kierunek badań jako „ocena wpływu parametrów pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację jonów żelaza w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*” (s. 12). Biorąc pod uwagę wyniki zrealizowanych badań, proponowałabym tu wskazanie raczej na działania zmierzające do optymalizacji parametrów, co zawiera również przeprowadzoną ocenę wszystkich wariantów zmiennych zastosowanych w badaniach. Przedstawione hipotezy badawcze są logiczne, oparte na związku przyczynowo skutkowym i stanowią przejrzystą ilustrację kolejnych etapów pracy, a ich eksperymentalna weryfikacja daje jednoznaczne rozwiązanie postawionego problemu naukowego.

Rozdział *Materiał i metody badawcze* wskazuje szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 11 B1 jako materiał badawczy. Rzeczywiście, cykl badań został przeprowadzony z wykorzystaniem tylko tego szczepu. Mając na uwadze duże zróżnicowanie międzyszczepowe w obrębie gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, interesujące byłoby wskazanie, na jakiej podstawie wybrano właśnie ten szczep drożdży. Czy sprawdzano akumulację żelaza i witaminy B₁₂ dla innych szczepów drożdży piekarskich w warunkach optymalnych dla szczepu 11 B1? Czy istnieją jakieś przesłanki o powtarzalności dobranych parametrów akumulacji dla drożdży innych gatunków? Mam nadzieję znaleźć odpowiedź na te pytania podczas dyskusji z Panią mgr Karoliną Nowosad w czasie obrony pracy doktorskiej. Z formalnego punktu widzenia zwracam uwagę na zapis na stronie 13: „szczep *Saccharomyces cerevisiae* 11 B1 pochodzący z kolekcji Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie”. Czy zapis dotyczy Kolekcji czystych kultur drobnoustrojów?

Rozdział opisujący metodologię badań zawiera listę zadań badawczych (s. 13). Moim zdaniem, ten element pracy ilustrujący zakres badań, powinien raczej znajdować się w rozdziale *Cel i zakres pracy doktorskiej oraz hipotezy badawcze*. Na liście zadań badawczych w podpunkcie „uzyskanie maksymalnej akumulacji jonów żelaza w *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach traktowania hodowli pulsacyjnym polem elektrycznym” znajduje się punkt „elektroporacja błon komórek drożdży przy wzrastającym

stężeniu jonów żelaza". Czy przeprowadzono badania innych parametrów skuteczności elektroporacji błon komórkowych oprócz oceny stężenia jonów żelaza wewnątrz komórek drożdży?

Dobór metod badawczych jest prawidłowy. Do rutynowych oznaczeń zastosowano klasyczne metody badawcze t. jak: hodowle okresowe drożdży, metoda spektrofotometryczna do oznaczania stężenia biomasy drożdży, metoda mikroskopowa z barwieniem błękitem metylenowym do określania żywotności populacji drożdży, modyfikację testu stosowanego w piekarnictwie do oceny siły pędnej drożdży, metody normatywne do oznaczenia składu produktów wytworzonych z użyciem drożdży suplementowanych jonami żelaza i witaminą B₁₂, standardowe techniki oznaczania cech organoleptycznych produktów spożywczych. Do realizacji czasowej elektroporacji komórek drożdży programowanej wielkością i czasem trwania PEF oraz czynnikami środowiska wykorzystano unikatowy zestaw zawierający jednobiegunowy generator fali prostokątnej ECM 830 (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) o szerokim zakresie regulacji parametrów elektroporacji. Do oceny kumulacji jonów żelaza i witaminy B₁₂ zastosowano nowoczesne techniki analityczne t. jak: atomowa spektrometria absorpcyjna (FAAS), wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), mikroskopia fluorescencyjna, spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR). Podkreślam wielość i różnorodność zastosowanych metod analitycznych oraz ich umiejętny wybór. Pani mgr Karolina Nowosad biegle posługuje się różnorodnymi technikami badawczymi, swobodnie i celowo łącząc standardowe techniki mikrobiologiczne, analizy chemicznej i analizy żywności z zaawansowanymi technologicznie metodologiami badań na poziomie mikro- i makromolekularnym.

O ile w pełni zgadzam się z doбором metod oznaczania żywotności i aktywności fermentacyjnej drożdży ze zwiększoną akumulacją jonów żelaza do szybkiego screeningu uzasadnionego w badaniach optymalizacji parametrów PEF, to chciałabym z Doktorantką przedyskutować celowość zastosowania metod hodowlanych, czy określenia aktywności fermentacyjnej drożdży piekarskich z wykorzystaniem fermentografu dla próbek drożdży uzyskanych w optymalnych warunkach elektroporacji.

Dalsze moje uwagi do tej części pracy dotyczą sposobu prezentacji metodyki. Na s. 13 proponuję uściślić określenie „otrzymywanie produktów z drożdży wzbogaconych w żelazo oraz w żelazo i witaminę B₁₂”, gdyż badania w tej części dotyczą produktów spożywczych przygotowanych z wykorzystaniem wzbogaconych drożdży. W punkcie 8 na stronie 16 brak wskazania celu zastosowania spektroskopii ATR-FTIR.

Reasumując, pomimo drobnych uwag, wysoko oceniam warsztat badawczy oraz jego przemyślane i zasadne wykorzystanie przez Doktorantkę na poszczególnych etapach realizacji pracy doktorskiej.

Chociaż jako Recenzent nie czuję się uprawniona do oceny publikacji poddanych już uprzednio procesowi recenzji w czasopiśmie o wysokiej renomie, to w dalszej części mojej opinii za zasadne uważam odniesienie się do ich zawartości.

Obszerny przegląd piśmiennictwa obejmujący zarówno podstawy teoretyczne, mechanizm działania pulsacyjnego pola elektrycznego na żywe komórki, jak i zastosowanie w technologii żywności został przedstawiony w publikacji PI (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). Znaczące miejsce w tej publikacji zajmują studia literaturowe dotyczące wzbogacania drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w jony metali z wykorzystaniem techniki PEF, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Pani mgr Karoliny Nowosad, szerokim rozpoznaniu obszaru badawczego i świadomym podjęciu tematu pracy doktorskiej, z wyraźnie określonym celem aplikacyjnym. Podkreślam, że wstępny wybór zakresu parametrów pulsacyjnego pola elektrycznego został dokonany na podstawie danych literaturowych. Publikacja PI stanowiła również podstawę rozdziału *Uzasadnienie wyboru tematu pracy doktorskiej*.

Kluczową część pracy doktorskiej stanowiły badania zmierzające do intensyfikacji akumulacji jonów żelaza przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae* poprzez działanie pulsacyjnego pola elektrycznego oraz próba wyjaśnienia mechanizmu tego procesu (Publikacja PII: 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). Dobór soli żelaza oraz optymalizacja parametrów pulsacyjnego pola elektrycznego zostały przeprowadzone metodycznie, a Doktorantka konsekwentnie realizowała poszczególne etapy eksperymentów. Spośród pięciu soli (chlorek żelaza (II), siarczan żelaza (II), chlorek żelaza (III), cytrynian żelaza (III) i azotan (V) żelaza (III)) wybrano azotan (V) żelaza (III) w stężeniu 200 µg Fe³⁺/ml pożywki jako najlepsze źródło jonów żelaza zapewniające maksymalizację akumulacji tego pierwiastka w komórkach drożdży. Następnie, określono parametry PEF, przy których notowano najwyższą akumulację jonów żelaza przez komórki drożdży (napięcie 1500 V, szerokość impulsu 10 µs, czas działania 20 min, liczba impulsów 1200) przy założonym wieku hodowli drożdży 20 godzin. Zwracam uwagę na niezręczne sformułowanie tytułu rozdziału 5.2. *Optymalizacja parametrów PEF i jej wpływ na akumulację jonów żelaza w komórkach drożdży* (s. 21). W eksperymentach zmierzających do określenia warunków maksymalizacji akumulacji jonów żelaza, przyjęto założony wiek hodowli drożdży jako 20 godzin. Ze względu na różnice wrażliwości na stres środowiskowy komórek drożdży pochodzących z różnych faz wzrostu hodowli okresowej, ich odpowiedź na działanie PEF i obecność soli żelaza może być odmienna, co zostało podjęte w dyskusji na stronie 24 opracowania. Szkoda, że w opracowaniu zabrakło opisu doboru czasu hodowli, chociaż

takie badania zostały przeprowadzone i przedstawione w publikacji PII (s. 8). Uważam, że ten etap pracy jest szczególnie istotny, a odpowiednie przygotowanie biomasy drożdży może być jednym z krytycznych czynników eksperymentów. Proszę o wyjaśnienie, czy określono fazę wzrostu dla 20-godzinnej hodowli szczepu stosowanego w badaniach oraz czy biomasa drożdży przygotowana w poszczególnych eksperymentach była standaryzowana. Czemu można przypisać istotne zmiany poziomu biomasy drożdży po działaniu PEF?

Kolejny rozdział opracowania 5.3. *Ocena zmian biomasy i przeżywalności drożdży po działaniu PEF* opisuje zmiany żywotności komórek i poziomu biomasy w warunkach eksperymentów. Proponuję doprecyzowanie tytułu poprzez wskazanie parametru oceny biomasy, np. poziomu, plonu biomasy. Na wykresach 11 (s. 25), 12 (s. 26) i 13 (s. 27) brakuje oceny statystycznej poziomu biomasy. W tym etapie badań Pani mgr Karolina Nowosad dokumentuje stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* po działaniu PEF w obecności wybranej soli żelaza, co jest niezwykle istotne przy założeniu wykorzystania żywej biomasy drożdży do produkcji żywności.

Za bardzo wartościowe uważam badania zmierzające do wyjaśnienia sposobu akumulacji jonów żelaza w komórkach drożdży oraz ich potencjalnych interakcji ze strukturami wewnątrzkomórkowymi. Ta część dysertacji jest bardzo dobrze opisana i udokumentowana. Oprócz wizualizacji akumulacji jonów żelaza w komórkach drożdży techniką mikroskopii fluorescencyjnej, zastosowana analiza widm ATR-FTIR wskazuje na niewątpliwe zmiany płynności i sztywności cytomembran oraz interakcje jonów żelaza z łańcuchami polipeptydowymi, polisacharydami ściany komórkowej i fosfolipidami błon plazmatycznych. Badania te stanowią ważny przyczynek do wyjaśnienia mechanizmu działania pulsacyjnego pola elektrycznego na komórki drożdży oraz jego wspomagającej roli w akumulacji mikroelementów.

Rozdział dysertacji 5.5. *Analiza właściwości fermentacyjnych drożdży wzbogaconych w jony żelaza* opisuje badania ukierunkowane jedynie na sprawdzenie aktywności drożdży podczas fermentacji ciasta. Rozumiem, że tak zaprojektowane testy aktywności fermentacyjnej miały wykazać przydatność drożdży o wysokiej zawartości żelaza w piekarnictwie. Wprowadzenie istotności statystycznej różnic pomiędzy aktywnością drożdży C2 i Fe+PEF na Rysunku 16 (s. 31) ilustrującym wyniki tych badań, ułatwiłoby ocenę. Proszę również o doprecyzowanie opisu osi rzędnych na Rysunku 16. Ta część dysertacji wskazuje nie tylko na potencjalnie ograniczoną przydatność technologiczną drożdży piekarskich charakteryzujących się podwyższoną zawartością żelaza, ale również podejmuje próbę oceny toksycznego działania jonów żelaza na komórki *Saccharomyces cerevisiae*.

Ostatni etap pracy, to mocno zaakcentowany aspekt aplikacyjny i wprowadzenie idei suplementacji diety związkami żelaza poprzez produkty żywnościowe o potencjalnych walorach prozdrowotnych. Podkreślam tu dywersyfikację zastosowania kultury drożdży

i propozycję dwóch produktów; podplomyków do wypieku których zastosowano żywą kulturę drożdży i wysuszonej biomasy drożdży w postaci płatków drożdżowych. Słusznie, w ocenie Doktorantki, drożdże o wysokim obciążeniu jonami żelaza ze względu na niską aktywność fermentacyjną, miałyby znacznie ograniczone zastosowanie w produkcji pieczywa. Propozycja podplomyków, gdzie konsument spodziewa się nieco odmiennego reologicznie i sensorycznie produktu jest bardzo interesującym rozwiązaniem, również marketingowym. Badania zawarte w publikacji PIII (Nowosad K., Sujka M. 2021. *The use of iron-enriched yeast for the production of flatbread. Molecules* 26(17), 5204) stanowią obszerną ocenę podplomyków zarówno w aspekcie wartości odżywczych i biodostępności żelaza, jak również cech organoleptycznych. Umiejętnie przedstawiono walory produktu powstałego z wykorzystaniem drożdży poddanych działaniu pulsacyjnego pola elektrycznego w obecności soli żelaza, wskazując na jego obniżoną wartość kaloryczną i zachowanie indeksu glikemicznego, w porównaniu z produktem na bazie drożdży nie poddawanych modyfikacjom.

Drugi z proponowanych przez Panią mgr Karolinę Nowosad produktów, to potencjalny suplement diety w formie płatków drożdżowych wzbogacanych w jony żelaza i witaminę B₁₂, jest w moim odczuciu rozszerzeniem oferty suplementacji diety dla świadomego konsumenta, również jak wskazują badania, potencjalnie dla osób z insulinopornością i cukrzycą. Płatki drożdżowe zostały także starannie scharakteryzowane pod kątem ich wartości żywieniowej (publikacja PIV: Nowosad K., Sujka M., Wyrostek J. (2022). *Preparation of yeast flakes enriched with iron and vitamin B₁₂ using a pulsed electric field technology. Journal of Food Process Engineering*, e14245). Płatki z biomasy drożdży fortyfikowanych jonami żelaza i witaminą B₁₂ oraz traktowanych pulsacyjnym polem elektrycznym mogą stanowić interesujący produkt ze względu na wyższą biodostępność tych substancji w porównaniu z niemodyfikowaną biomasą i akceptowanymi przez panel sensoryczny walorami organoleptycznymi.

Uwagi szczegółowe

Przedstawione poniżej uwagi są w większości natury edytorskiej, nie umniejszają wartości pracy i przytaczam je z obowiązku recenzenta.

- Zwracam uwagę na stosowane w pracy określenia żargonowe, używane w codziennej pracy laboratoryjnej, np. „w komorze obróbki” (s. 10), „komora zabiegowa” (s. 10, Rys. 1), „otrzymywanie produktów z drożdży” (s. 13), „roztwór mieszano za pomocą obracającego się magnesu” (s.15), „obróbki PEF” (s. 28)
- W podpisie Rys. 9 (s. 23), Rys. 12 (s. 26) „ilość impulsów” powinna być zastąpiona przez określenie „liczba impulsów” ze względu na ich policzalność.

- Proszę o korektę sformułowania „występują jednak znaczne rozbieżności w optymalnym czasie hodowli, co może wynikać z różnych warunków jej prowadzenia” (s. 24).
- Doprecyzowania wymaga sformułowanie „Przedstawione w publikacji PII wyniki oznaczania biomasy oraz przeżywalności drożdży były wysokie” (s. 24).
- Proszę o wyjaśnienie sformułowania „Dzięki temu jony żelaza mogły przejść przez ścianę komórkową i przestrzeń peryplazmatyczną i dotrzeć na powierzchnię błony plazmatycznej, w dużym stopniu w wyniku działania PEF” (s. 30).
- Proszę o korektę sformułowań „może być również związana z obecnością wysokiego stężenia jonów żelaza w komórkach” (s. 31), gdyż to jony znajdują się w komórkach w określonym stężeniu oraz podobnie „w prawidłowych stężeniach kwasu żołądkowego” (s. 35) i „drożdże wzbogacone o to samo stężenie obu substancji, ale bez PEF” (s. 36).
- W podpisie Rys. 18 (s. 40) brakuje określenia „sensorycznej” w odniesieniu do wyników oceny.

Konkluzje recenzji

Podsumowując, stwierdzam że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodząc możliwości celowego zastosowania pulsacyjnego pola elektrycznego do wzbogacania komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w jony żelaza i wykorzystania tak fortyfikowanych drożdży do produkcji żywności funkcjonalnej. Sformułowane w rozprawie hipotezy badawcze zostały pozytywnie zweryfikowane. Praca poszerza stan wiedzy w dyscyplinie technologii żywności i żywienia w obszarze sposobu akumulacji jonów żelaza w komórkach drożdży piekarskich oraz ich potencjalnych interakcji ze strukturami wewnątrzkomórkowymi. Rozprawa doktorska ma również istotny aspekt aplikacyjny, wskazując na potencjalne wykorzystanie drożdży fortyfikowanych jonami żelaza w obecności pulsacyjnego pola elektrycznego w produktach spożywczych, w tym przeznaczonych dla osób z szczególnymi wymaganiami żywieniowymi. Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną mgr inż. Karoliny Nowosad w dyscyplinie technologia żywności i żywienia oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa Pani mgr inż. Karoliny Nowosad spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami) i przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia

Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Karoliny Nowosad do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z wnioskiem o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej. W mojej opinii praca doktorska Pani mgr inż. Karoliny Nowosad zasługuje na wyróżnienie z następujących powodów:

- praca istotnie poszerza stan wiedzy w dyscyplinie technologii żywności i żywienia, w obszarze sposobu akumulacji jonów żelaza w komórkach drożdży piekarskich oraz ich potencjalnych interakcji ze strukturami wewnątrzkomórkowymi
- rozprawa doktorska ma cenny aspekt aplikacyjny, wykazując celowość zastosowania drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* wzbogaconych jonami żelaza oraz jonami żelaza i witaminą B₁₂ w obecności pulsacyjnego pola elektrycznego w produktach spożywczych, w tym przeznaczonych dla osób z szczególnymi wymaganiami żywieniowymi
- wysoką wartość publikacyjną i aktualność badań objętych rozprawą doktorską; praca stanowi homogeny zbiór czterech monotematycznych publikacji w czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku wpływu *Impact factor* równym 16,997 (zgodnie z rokiem opublikowania).

Arkadiusz - Skrzypiek