

Olsztyn, dn. 17-02-2025 r.

Dr hab. Magdalena Olszewska, prof. UWM
Katedra Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA
rozprawy doktorskiej Pani Kübra Küçükgöz
zatytułowanej
„Development and nutritional assessment of potentially probiotic non-dairy product – *in vitro* research”
(Opracowanie i ocena wartości odżywczej potencjalnie probiotycznego produktu
niemlecznego – badania *in vitro*)

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Moniki Trząskowskiej, prof. SGGW
w Katedrze Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności,
Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Recenzja została przygotowana na podstawie pisma z dnia 16.12.2024 r. wystosowanego przez Przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, prof. dr hab. Mirosława Słowińskiego.

Wybór i znaczenie tematyki

Fermentacja surowców roślinnych, z założenia metoda konserwacji żywności, stała się sposobem zwiększenia asortymentu produktów spożywczych. Poszukiwanie nowych matryc znajduje uzasadnienie w obliczu wzrastającego zainteresowania produktami, które łączą np. funkcjonalność z wygodą. Projektowanie i rozwój nowych asortymentów powinny bazować na wykorzystaniu skutecznych i bezpiecznych szczepów, które wykazują zdolności do produkcji bioaktywnych metabolitów i właściwości technologiczne poprawiające wartość odżywczą i cechy sensoryczne produktów. Podjęta w rozprawie doktorskiej tematyka oceny możliwości produkcji fermentowanych, potencjalnie probiotycznych produktów pochodzenia roślinnego oraz biodostępności składników bioaktywnych za pomocą metod *in vitro* jest potrzebna, aktualna i wpisują się w nurt prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia badań nad żywnością funkcjonalną. Rozprawa Pani Kübra Küçükgöz wnosi nową wiedzę i może być przydatna w dalszych badaniach nad korzystnym wpływem potencjalnie probiotycznej żywności pochodzenia roślinnego na organizm człowieka, jak również w śledzeniu preferencji konsumentów i trendów w rozwoju tego typu żywności.

Formalna ocena rozprawy

Przedstawiona przez Panią Kübra Küçükgöz do oceny rozprawa doktorska zatytułowana „Development and nutritional assessment of potentially probiotic non-dairy product – *in vitro* research” o polskim tytule: „Opracowanie i ocena wartości odżywczej potencjalnie probiotycznego produktu niemlecznego – badania *in vitro*” składa się z cyklu 5 publikacji anglojęzycznych poprzedzonych opisem w języku angielskim o układzie typowy dla tych rozpraw. W opisie znajduje się streszczenie w języku angielskim i polskim, wstęp, cel i zakres badań, hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki i dyskusja oraz wnioski

i odwołania literaturowe. Cztery z tych prac to prace badawcze, natomiast jedna to praca przeglądowa z podjętej przez Doktorantkę tematyki badań. Rozprawę uzupełniono oświadczeniami o wkładzie pracy Doktorantki oraz współautorów publikacji. W większości prac Pani Kübra Küçükgöz jako swój wkład zadeklarowała opracowanie koncepcji i metodologii badań, przeprowadzenie badań, analizę wyników badań, przygotowanie pierwotnej wersji tekstu oraz korekty tekstu, co świadczy o Jej znaczącej roli w ich powstanie. Spośród nich, niejasne jest tylko kto opracował koncepcję pracy oraz przeprowadził analizę wyników badań w drugiej publikacji z cyklu. Niemniej jednak, we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w trzech autorem korespondencyjnym. Publikacje zostały opublikowane w latach 2022-2025 w czasopismach z listy JCR: *Nutrients* o współczynniku oddziaływania *Impact Factor* (IF) 4,8-5,9, *Food and Bioprocess Technology* o IF 3,5, *Food Research International* o IF 7,0 oraz *Food Chemistry* o IF 8,5. Wymienione czasopisma zostały przypisane do dyscypliny technologia żywności i żywienia i są czasopismami wysoko punktowanymi według ministerialnego wykazu czasopism naukowych. W opracowaniu zabrakło mi wskazania przez Doktorantkę pozostałych osiągnięć, informacji w jakich projektach/zadaniach badawczych uczestniczyła, a także czy i z jakich staży bądź programów wymiary akademickiej korzystała. Budzi to moją ciekawość z tego powodu, że trzy publikacje powstały we współpracy z ośrodkami zagranicznymi i niejasne jest czy Doktorantka je odwiedziła i prowadziła w nich badania. Co więcej, Doktorantce przypisano kierowanie projektem w dwóch publikacjach, co podkreśla Jej zaangażowanie, ale nie wiadomo o który projekt/zadanie/dofinansowanie chodzi. Z obowiązku wspomnę o błędach w pisowni czy błędnie przypisanych odnośnikach do publikacji, które jednak nie mają wpływu na ocenę merytoryczną pracy. Stwierdzam, że praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim.

Merytoryczna ocena rozprawy

Rozprawa doktorska Pani Kübra Küçükgöz dotyczy oceny możliwości produkcji fermentowanych produktów niemlecznych przy użyciu szczepów bakterii potencjalnie probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus* oraz wartości odżywczej otrzymanych produktów odnoszącej się losów składników bioaktywnych w trakcie pasażu przez model *in vitro* przewodu pokarmowego człowieka. Ze względu na to, że zakres tych badań obejmuje produkty na bazie puree jabłkowego oraz przecieru z dodatkiem buraka czerwonego (ketchup) uważam, że tytuł pracy powinien zawierać opracowanie produktów a nie produktu bądź Doktorantka mogła skupić się tylko na tym drugim, zwłaszcza, że aż trzy artykuły z cyklu dotyczą ketchupu fermentowanego z udziałem/dodatkiem pałeczek *Lactobacillus*.

To właśnie bakterie z rodzaju *Lactobacillus* posiadają wiele pożądanych właściwości dających efekt utrwalenia i tworzenia właściwych cech sensorycznych gotowych wyrobów, a także korzyści zdrowotne dla konsumenta. Obecnie poszukuje się nowych, potencjalnie probiotycznych drobnoustrojów, najczęściej izolowanych z samo fermentowanej żywności. Zasadne jest, aby kultury probiotyczne stosowane w produktach fermentowanych pochodzenia roślinnego były w pierwszej kolejności izolowane z materiału roślinnego, który może stwarzać znaczne wyzwania technologiczne i fizjologiczne, do których inne szczepy (np. pochodzenia jelitowego) mogą nie być przystosowane. W pracy przeglądowej (P1) Doktorantka pokazała, że fermentacja surowców roślinnych z zastosowaniem głównie pałeczek *Lactobacillus* pozwala na otrzymanie wielu nowych produktów, różniących się cechami organoleptycznymi w zależności od użytego surowca i szczepu bakterii. Literatura przedmiotu wskazuje na to, że szczepy wyizolowane z materiału roślinnego wykazują *in vitro* korzystne działanie prozdrowotne. Doktorantka argumentuje, że fermentacja surowców

roślinnych może być sposobem zwiększenia opcji wegańskich zawierających probiotyki oraz ograniczenia negatywnego wpływu działalności człowieka na środowisko przyrodnicze, np. wynikającej z uprzemysłowionej produkcji zwierząt. Pomimo tego, że w metodologii przeglądu brakuje kilku szczegółów, np. podania liczby znalezionych i odrzuconych artykułów, praca ta została przygotowana starannie i stanowi dobrze przygotowane wprowadzenie i uzasadnienie do podjęcia w/w tematyki pracy doktorskiej. Żałuję, że po wykonaniu przeglądu, nie przeprowadzono metaanalizy, do czego szczególnie mocno zachęcam w dalszych badaniach.

Prace **P2** i **P3** dotyczyły oceny możliwości produkcji fermentowanych mieszanek przecieru jabłkowego z płatkami i otrębami owsianymi (P2) oraz ketchupu z burakiem czerwonym (P3) przy udziale dwóch szczepów z rodzaju *Lactobacillus*: *L. rhamnosus* K3 oraz *L. johnsonii* K4. Efektem prac P2 i P3 Doktorantka stwierdza, że wyroby otrzymane po fermentacji są odpowiednimi „nośnikami” szczepów probiotycznych. W tym miejscu, chciałabym zapytać Doktorantkę o kryteria doboru szczepów. W pracy odnajduję krótką informację o odpowiedniej kwasowości oraz minimalnym wpływie na cechy sensoryczne produktów po fermentacji. Jak wyglądały badania dobierające szczepy do matrycy oraz warunki samej fermentacji? Jakie surowce i szczepy wstępnie testowano? Dlaczego odrzucono *Lactobacillus brevis* albo nie brano pod uwagę *Lactobacillus plantarum* często wykorzystywane w procesach fermentacyjnych produktów owocowo-warzywnych? Czy sprawdzała/rozważała Pani sprawdzenie zdolności wybranych przez siebie szczepów do wytwarzania enzymów i zewnątrzkomórkowej macierzy polisacharydowej EPS? Jaki jest stan wiedzy w tym zakresie w odniesieniu do izolatów z surowców pochodzenia roślinnego i czy według Doktorantki bądź literatury, którą przeglądała jest to cecha nadrzędna dla tych szczepów?

W pracy **P2** Doktorantka skupiała się na ocenie przeżywalności szczepów podczas symulowanego procesu trawiennego w zależności od matrycy mieszanek z dodatkiem zbożowym. Próbkę z otrębami owsianymi wykazywały wyższe wskaźniki przeżywalności obu szczepów podczas symulowanego trawienia niż te z płatkami, co wskazuje na lepsze „właściwości nośnikowe” otrąb. Zatem nasuwają się następujące pytania do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej: Jak wytłumaczyć zaistniałe zjawisko i dlaczego nie obserwujemy różnic między szczepami analogicznie jak zostały one zaobserwowane w pracy P3? Zawartość polifenoli i antyoksydantów w produktach fermentowanych, nie poddanych jeszcze trawieniu była mniejsza niż w próbkach niefermentowanych. Natomiast, efektem symulowanego trawienia, fermentowane mieszanki cechowały się zwiększoną zawartością i biodostępnością polifenoli i przeciwutleniaczy (ABTS). Co więcej, aktywność szczepów *Lactobacillus* wpłynęła na skład kwasów organicznych obu mieszanek. Natomiast Doktorantka błędnie stwierdza, że zawartość kwasu jabłkowego w próbkach fermentowanych była większa. Z wykresów wynika, że było odwrotnie, natomiast kwas propionowy nie pojawiał się w nich, chyba że po procesie trawienia. Porównując same matryce, próbki z otrębami wykazywały większą zawartość kwasu jabłkowego i octowego niż próbki z płatkami owsianymi, a płatki z kolei kwasu mlekowego. Profil sensoryczny produktów uległ zmianie po fermentacji, ale ogólna ich jakość była powyżej 6 na 10 dla każdego z nich. Doceniam, że ta i kolejna praca (P3) zawierają ocenę sensoryczną i analizę PCA korelującą określone cechy (wyróżniki) produktów z działalnością bakterii, np. wyczuwalnego w próbkach kwasu z *L. johnsonii* K4.

W pracy **P3** z kolei Doktorantka oceniła przeżywalność szczepów podczas chłodniczego przechowywania opracowanego przez siebie ketchupu oraz pasażu przez górny odcinek przewodu pokarmowego w modelu *in vitro* (TIM-1). Współczynnik przeżywalności *L. johnsonii* K4 podczas pasażu wyniósł 27%, który był znacznie wyższy w porównaniu z 2,8% dla *L. rhamnosus* K3. Fermentacja z *L. johnsonii* K4 poprawiła cechy sensoryczne ketchupu, który osiągnął wyższą jakość ogólną w porównaniu z kontrolą czy kechupem fermentowanym *L. rhamnosus* K3. Czy to były przesłanki przemawiające za tym, żeby wytypować szczep *L. johnsonii* K4 do dalszych badań? Zabrakło mi takiego ogniwa łączącego publikację P3 z publikacjami P4/P5. Ostatecznie Doktorantka stwierdza, że produkty pochodzenia roślinnego mogą być nośnikami potencjalnie probiotycznych szczepów zachowując ich żywotność podczas przechowywania i trawienia, jednocześnie poprawiając ich jakość sensoryczną. Nasuwają się następujące pytania: Dlaczego Doktorantka skupiła się na badaniu tylko treści jelitowej z pominięciem treści żołądkowej w celu określenia wpływu kwasowości żołądka na przeżywalność szczepów? Dlaczego nie wprowadzano do układu trawiennego bakterii w buforze (nie w matrycy żywnościowej)? Czy Doktorantka spodziewała się wyższego poziomu przeżywalności bakterii i czy możemy mówić o efekcie ochronnym matrycy ketchupu dla bakterii? Prosiłabym o rozwinięcie i szersze omówienie zagadnienia przeżywalności *Lactobacillus* w przecierach warzywnych podczas publicznej obrony. Podsumowując (P2 i P3), prace zostały przygotowane starannie, a ich metodologia została dobrze przemyślana. Jednocześnie uważam, że dużą wartością pracy P3 było zastosowanie dynamicznego modelu *in vitro* przewodu pokarmowego TIM-1 do badania przeżywalności szczepów *Lactobacillus*, który oferuje bardziej dokładną symulację warunków w różnych częściach przewodu oraz kinetyki pasażu pokarmu przez żołądek i jelita.

Do dalszych badań (**P4**) wytypowano szczep *L. johnsonii* K4. W badaniach tych skupiono się na matrycy ketchupu fermentowanego tym szczepem i niefermentowanego oraz ocenie poziomu uwalnianych polifenoli i ich biodostępności podczas pasażu przez górny odcinek przewodu pokarmowego (TIM-1) oraz interakcji mikrobioty jelitowej z polifenolami wynikiem procesów fermentacyjnych w układzie okrężnicy (TIM-2). Pracę cechuje szeroki zakres badań. W związku z tym, Doktorantka mogła przedstawić schemat porządkujący ich etapy i objaśniający parametry procesów i/lub zastosowane metody. Stwierdzono, że fermentacja ketchupu szczepem *L. johnsonii* K4 zwiększa uwalnianie związków bioaktywnych wynikiem trawienia, ze względu na wyższy odzysk większości kwasów fenolowych, flawonoidów i betalain. Aczkolwiek uważam, że ogólnie mniejsza biodostępność polifenoli podczas trawienia TIM-1 ketchupu fermentowanego względem niefermentowanego wymaga szerszego omówienia korzyści i wad tego stanu rzeczy. Podczas gdy niektóre z tych związków zanotowały wzrost podczas fermentacji w okrężnicy, inne ulegały degradacji, co wskazuje na dynamiczny proces metabolizmu polifenoli w środowisku jelitowym. Żałuję, że nie pokazano czy wyniki z ketchupu nie i fermentowanego są istotne statystycznie bądź zaprezentowano je w inny sposób niż w tabeli, np. w postaci wykresów liniowych ułatwiających ich interpretację. Bardzo interesujące są wyniki dotyczące korelacji między poszczególnymi polifenolami i zidentyfikowanymi w materiale kałowym rodzajami bakterii. Na przykład, betagaryna była pozytywnie skorelowana z maksymalnie 5 rodzajami bakterii, a betanina nawet z 15. Większość z tych taksonów wykazywała silne współzależności przynajmniej z jednym związkiem polifenolowym, a *Prevotella* 9 przynajmniej z trzema z nich. Jest to ważny aspekt pracy dający wgląd w złożone mechanizmy leżące u podstaw interakcji polifenole-mikrobiota. Biorąc pod uwagę, że duża część dotychczasowych badań *in vitro* nad biodostępnością składników żywności dotyczy trawienia w żołądku i dwunastnicy,

zatem określają związki, które są dostępne do wchłaniania w jelicie cienkim i nie pozwalają na określenie metabolitów w jelicie grubym po interakcji z mikrobiotą, ta (P4) i następna (P5) praca Doktorantki zyskują na szczególnym znaczeniu.

Celem pracy **P5** była ocena wpływu niefermentowanego i fermentowanego ketchupu tym samym szczepem *L. johnsonii* K4 na skład mikrobioty jelitowej, a także produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs) w modelu okrężnicy (TIM-2). W badaniach uwzględniono próbę kontrolną w postaci mieszanki węglowodanów (SIEM). Zidentyfikowano 21 taksonów bakterii. Bez względu na to czy ketchup fermentowano czy też nie, podczas symulowanego pasażu przez okrężnicę zaobserwowano wzrost udziału taksonów produkujących maślan, w tym *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Ruminococcaceae*, *Ruminiclostridium* i *Anaerostipes*. Z drugiej strony, nastąpił spadek liczby potencjalnie patogennych rodzajów *Desulfovibrio* i *Escherichia-Shigella*. Doktorantka stwierdza również, że te same próbki charakteryzowały się większą zawartością SCFAs niż kontrolna. Żałuję, że nie przeprowadzono analizy statystycznej tych wyników, która mogła potwierdzić tę obserwację oraz pokazać więcej, np. istotnie większą zawartość propionianu w próbkach fermentowanych. Obecnie przybywa informacji na temat roli *L. johnsonii* w łagodzeniu zapalenia jelita grubego i przebudowie mikrobioty jelitowej poprzez zwiększenie liczebności bakterii produkujących SCFAs i stężenia kwasu propionowego w jelicie. Doktorantka bardzo umiejętnie i słusznie opisała współzależności między takimi bakteriami jak *Blautia* czy *Ruminiclostridium* i maślanem/octanem wraz z ich funkcją w utrzymaniu zdrowych jelit, dlatego też uważam, że mogła pozwolić sobie na dalsze dywagacje odnośnie do propionianu. Doktorantka zauważa również, że zawartość SCFAs w próbkach fermentowanych była mniejsza w porównaniu z niefermentowanymi i było to spowodowane zużyciem substratów do fermentacji przez *L. johnsonii* K4 i mniejszą ich dostępnością dla mikrobioty jelitowej. Ponadto zaobserwowała, że *L. johnsonii* K4 moduluje skład mikrobiomu jelitowego poprzez zwiększenie obecności korzystnych bakterii, takich jak *Lactobacillus*, *Weissella*, czy *Prevotella*.⁹ Moim zdaniem, dalszych wyjaśnień wymaga *Dorea* czy *Roseburia*. Wraca również pytanie o statystyczną istotność tych obserwacji. Niemniej jednak, praca ta jest wartościowym opracowaniem, a zwłaszcza część dotycząca zmian w różnorodności mikrobioty jelitowej. Doktorantka szczegółowo omówiła wyniki badań tej pracy i umiejętnie je przedyskutowała, podejmując niemały wysiłek w celu wyjaśnienia skomplikowanych zjawisk zachodzących podczas trawienia/fermentacji w okrężnicy. Kolejną, ogromną zaletą pracy - podobnie jak w poprzedniej pracy P4 - jest wykorzystanie najnowocześniejszych, wysokosprawnych narzędzi badawczych oraz platform do tworzenia korelacji i budowania map ciepła.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Kübra Küçükgöz pt. „Development and nutritional assessment of potentially probiotic non-dairy product – *in vitro* research” (Opracowanie i ocena wartości odżywczej potencjalnie probiotycznego produktu niemlecznego – badania *in vitro*) wpisuje się w nurt badań prowadzonych w zakresie dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia, a uzyskane wyniki posiadają duży walor poznawczy. Ponadto, Doktorantka wybraną przez siebie tematyką wpisuje się w najnowsze trendy w rozwoju żywności funkcjonalnej i przemysłu spożywczego, wskazując na potencjał innowacyjnych produktów, np. ketchupu wzbogaconego o polifenole i korzystne bakterie w kontekście zdrowia jelit i ogólnego dobrostanu. Pod względem merytorycznym oceniam pracę bardzo wysoko, a wspomniane błędy czy sugestie nie wpływają na jej wartość naukową. Forma dysertacji, oparta o cykl aż 5 publikacji, zobligowała do dobrego

zaplanowania i wykonania badań, jak również przygotowania i opublikowania artykułów w cenionych czasopismach. Zaprezentowany w ramach rozprawy cykl publikacji świadczy, że Doktorantka zrealizowała swoje założenia i nabyła cenne umiejętności prowadzenia badań naukowych, które będzie mogła wykorzystać w przyszłej pracy naukowo-badawczej.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do oceny rozprawą doktorską Pani Kübra Küçükgöz stwierdzam, że spełnia ona ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 742 z późniejszymi zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani Kübra Küçükgöz do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy, a w szczególności wkład Doktorantki w powstanie cyklu publikacji, które wnoszą nowe informacje do dyscypliny z zakresu nie tylko przeżywalności szczepów potencjalnie probiotycznych podczas stresu wywołanego pasażem przez przewód pokarmowy człowieka, ale także dopiero gromadzonej wiedzy o biodostępności składników aktywnych i ich interakcji z mikrobiotą jelitową składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Kübra Küçükgöz.