

Dr hab. inż. Fabian Dajnowiec
Katedra Inżynierii i Aparatury Procesowej
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 10.05.2020 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Turek pt. „Wpływ dodatku olejów roślinnych na powstawanie bioaktywnych kwasów tłuszczowych w mleku fermentowanym” zrealizowanej pod kierunkiem dr hab. inż. Moniki Wszolek, prof. UR w Katedrze Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kollątaja w Krakowie

Podstawą wykonania recenzji jest decyzja Rady Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kollątaja w Krakowie przedstawiona w piśmie (DTŻ 520-7-64/2020) dr hab. inż. Marcina Łukasiewicza, prof. UR z dnia 05.03.2020 r.

Ocena strony formalnej pracy

Przedstawiona do recenzji dysertacja posiada układ typowy dla prac naukowych o charakterze doświadczalnym przyjęty w pracach na stopień naukowy.

Praca liczy 223 stron, na które składa się 12 rozdziałów. Kolejne części to: Wstęp, Przegląd literatury Materiały i metody, Zakres analiz, Uzasadnienie tematu oraz Cel pracy, Wyniki i dyskusja, Wnioski Streszczenie, Abstract, Literatura, Wykaz tabel i rysunków oraz Aneks. Autorka w zasadniczej części pracy zamieściła 76 Tabel i 19 Rysunków obrazujących uzyskane wyniki przeprowadzonych eksperymentów i ich analiz. W załączonym aneksie znalazły miejsce 23 Tabele będące uzupełnieniem omawianych w rozdziale 6 wyników. Przedstawiona w rozdziale 10 bibliografia 17 stron i obejmuje 232 pozycje literatury. Znaczną część, bo około 75% stanowią źródła anglojęzyczne.

Ocena merytoryczna pracy

W części teoretycznej Doktorantka w sposób zwięzły przedstawiła zagadnienia związane z tematem i założonym celem przeprowadzonych prac badawczych tj. określeniem wpływu rodzaju kultury starterowej, dodatku oleju roślinnego i czasu chłodniczego

przechowywania otrzymanych produktów na zawartość kwasów tłuszczowych, szczególnie CLA.

Poszczególne podrozdziały przeglądu literatury w sposób poprawny przedstawiają dane literaturowe związane z różnymi właściwościami mleka fermentowanego, właściwości funkcjonalne i wartość żywieniową tłuszczu mlekowego, czy zdolność bakterii mlekowej do syntezy CLA. W pierwszej części pracy Doktorantka w sposób jasny i zwięzły scharakteryzowała różne mleka fermentowane, będące przedmiotem części doświadczalnej. Informacje dotyczące kefiru, jogurtu i mleka fermentowanego uwzględniają ich właściwości prozdrowotne oraz charakteryzują szczepy bakterii fermentacji mlekowej niezbędne do ich wytwarzania. W oddzielnych podrozdziałach zostały opisane właściwości tłuszczu mlecznego, prozdrowotne właściwości oleju z lnicznika siewnego (*Camelina sativa L. Crantz*) i oleju z orzechów włoskich (*Juglans regia L.*). Należy podkreślić, że oba opisane i zastosowane w badaniach oleje cechują się właściwościami prozdrowotnymi ze względu na zawartość cennych kwasów tłuszczowych. Zasadne zatem jest opisanie przez Doktorantkę w następnym rozdziale znaczenia żywieniowego kwasów omega 6 i omega 3. Uzupełnieniem opisu literatury dotyczącego zagadnień związanych z częścią badawczą jest przybliżenie możliwości zastosowania różnych rodzajów olejów roślinnych w produkcji mleka fermentowanego oraz funkcji enzymów lipolitycznych - jednych z ważniejszych grup enzymów. Należy podkreślić, że przedstawiona analiza literatury potwierdza konieczność podjęcia badań i zwrócenia uwagi na właściwości prozdrowotne mleka fermentowanego dodatkowo wzbogaconego w oleje o właściwościach prozdrowotnych. Na szczególną uwagę w tej części pracy zasługuje opis literatury dotyczącej zagadnień związanych ze zdolnościami bakterii fermentacji mlekowej do syntezy sprzężonego kwasu linolowego (CLA). Potwierdzeniem słuszności podjętych przez Doktorantkę prac jest wymieniona na 33 stronie rozprawy publikacja w której Fernadez i współautorzy wykazali, że dostarczenie do organizmu bioaktywnych lipidów tłuszczu mlekowego np. CLA powinno odbywać się dzięki spożywaniu pełno tłuszczowych jogurtów. W mojej ocenie wzbogacanie jogurtu w prozdrowotne hydrolizowane oleje jest interesujące z naukowego punktu widzenia, a z uwagi na udowodnione przez Doktorantkę zwiększenie syntezy CLA i zawartości kwasu oleinowego i wakcenenowego godne podjęcia starań nad wdrożeniem produkcji w warunkach przemysłowych. Rozbudowana część teoretyczna bezsprzecznie przekonuje do słuszności podjętych badań. Autorka w sposób jasny i czytelny zwraca uwagę, że w badaniach będą wykorzystane substraty o cechach prozdrowotnych tj.

mleko, probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej, olej z lnicznika siewnego (*Camelina sativa L. Crantz*) i olej z orzechów włoskich (*Juglans regia L.*).

Przeprowadzone prace badawcze wpisują się w ogólny kierunek badań naukowych, w których podkreśla się znaczenie spożycia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i poszukuje sposobu ich dostarczenia do organizmu w produktach często spożywanych. Podsumowując tę część dysertacji należy podkreślić, że zaprezentowane w rozdziale Przegląd Literatury informacje w przejrzysty sposób wprowadzają czytelnika w zagadnienia omawiane w dalszej części pracy i uzasadniają sformułowanie tematu oraz hipotez badawczych. Bogata i aktualna literatura źródłowa potwierdza duży wkład pracy Doktorantki i przygotowanie do podjęcia badań.

Autorka sformułowała pięć hipotez badawczych definiujących kierunek podjętych badań. W ocenie recenzenta hipotezy są poprawnie sformułowane, natomiast należałoby rozważyć wprowadzenie kilku poprawek precyzujących treść hipotez przedstawionych na stronie 74. Powyższa sugestia dotyczy przytoczonych poniżej zdań: „Mikroorganizmy **zastosowane do produkcji** różnych rodzajów mleka fermentowanego są zdolne do syntezy sprzężonych dienów kwasów tłuszczowych z kwasu linolowego zawartego w oleju roślinnym” czy „Wykorzystanie enzymów lipolitycznych **do hydrolizy tłuszczu stosowanego jako dodatek** w procesie produkcji probiotycznego mleka ukwaszonego i jogurtu probiotycznego będzie skutkowało zmianą ich frakcji tłuszczowej oraz zwiększeniem zawartości CLA”. „Połączenie olejów roślinnych z drobnoustrojami obecnymi w kulturach startowych i bakteriami probiotycznymi, doprowadzi do otrzymania nowego produktu, o potencjalnie prozdrowotnych właściwościach”. Moja propozycja treści tej hipotezy jest następująca: połączenie w produkcji oleju lnicznika siewnego (*Camelina sativa L. Crantz*) lub oleju z orzecha włoskiego (*Juglans regia L.*) z drobnoustrojami obecnymi w kulturach startowych i bakteriami probiotycznymi, doprowadzi do otrzymania nowego produktu, o potencjalnie prozdrowotnych właściwościach”.

Prace eksperymentalne przeprowadzono według przedstawionych na stronach 49-73 treści, w których opisano: materiał badawczy, przebieg i organizację doświadczenia oraz zakres analiz. W części zatytułowanej „Materiał badawczy” mgr Katarzyna Turek przedstawiła informacje o podstawowych substratach zastosowanych do produkcji poszczególnych rodzajów mleka fermentowanego. W rozdziale wymienione zostały surowce stosowane w doświadczeniach, scharakteryzowane użyte kultury mleczarskie oraz przedstawione profile kwasów tłuszczowych oleju z nasion lnianki siewnej i orzechów włoskich oraz wskazane

zostało pochodzenie zastosowanych do hydrolizy lipaz. Podrozdział ten zawiera wszystkie niezbędne informacje. Jedyna moja uwaga dotyczy umieszczenia informacji typowo metodycznych, które są tu zbędne i powinny być umieszczone w innej części. Dotyczy to informacji o pomiarze świeżości oleju wg. PN-84/A-85803 i metodzie określenia dodatku lipazy (strona 50). W podrozdziale „Badania oraz analizy wstępne” zostały umieszczone informacje o sposobie doboru i ilości oleju roślinnego oraz określeniu dawki zastosowanych enzymów lipolitycznych niezbędnej do hydrolizy określonej objętości oleju. Rozdział „Przebieg i organizacja doświadczenia” w pełni oddaje dużą ilość pracy włożoną przez Doktorantkę w badania eksperymentalne. Całość badań podzielono na części wynikające z dużej wiedzy, którą Doktorantka przedstawiła w części literaturowej niniejszej pracy. Wymienione części stanowią logiczną całość. W pierwszej części w warunkach laboratoryjnych wyprodukowano kefir stosując zakwas ziaren kefirowych z dodatkiem oleju z orzechów włoskich oraz licznika siewnego. W drugiej części analizie poddano wzbogacone o szczepy probiotyczne kefiry i jogurty z dodatkiem oleju z orzecha włoskiego. Ostatnia część przedstawionej dysertacji dotyczy prac badawczych nad jogurtem i mlekiem ukwaszonym z dodatkiem zhydrolizowanego enzymatycznie oleju z orzecha włoskiego. W rozdziale 3.4 opisano zabiegi technologiczne przeprowadzone podczas produkcji poszczególnych produktów fermentowanych. Wartościową częścią tego rozdziału jest uzupełnienie treści o interpretację graficzną ilustrującą procesy jednostkowe zastosowane w technologii otrzymywania mleka fermentowanego. Każdy z wymienionych wariantów został zilustrowany na pięciu schematach blokowych, które przedstawiają kolejne etapy produkcji poszczególnych produktów. Do zastanowienia Autorce pozostawiam wprowadzenie drobnych zmian podczas przygotowywania publikacji do druku w recenzowanych czasopismach. Na schematach blokowych, jak również w opisie wskazane byłoby umieszczenie informacji jakiego rodzaju homogenizator został zastosowany w badaniach, jedno czy dwustopniowy? Jakie zostały zastosowane ciśnienia w procesie homogenizacji? Opis i schematy blokowe zawarte w tym rozdziale to również dobre miejsce na umieszczenie informacji do jakiego poziomu suchej masy znormalizowano mleko użyte do produkcji jogurtu. Zastosowanie sformułowania „szklane opakowanie jednostkowe o pojemności 200 cm³” jest zdecydowanie korzystniejsze niż to, którego użyła Doktorantka. Doprecyzowując parametry procesów jednostkowych dobrze jest używać znaku \pm informującego o ich odchyleniach od założonej wartości np. temperatura chłodzenia $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Zakończenie tego rozdziału stanowi opis procesu hydrolizy oleju z orzechów włoskich z zastosowaniem lipaz *Candida rugosa* i trzustki wieprzowej.

W kolejnym rozdziale „ZAKRES ANALIZ” Autorka przedstawiła i opisała metody analityczne niezbędne do osiągnięcia założonych celów. Na 11 stronach znalazły się opisy analiz składu chemicznego mleka fermentowanego, analiz mikrobiologicznych, analizy tekstury oraz zawartości kwasów tłuszczowych (WKT). Dodatkowo w rozdziale tym opisano wykonaną w pracy ocenę sensoryczną produktu przy zastosowaniu dwóch metod: oceny w skali w skali 5 punktowej i oceny w 9 – punktowej skali hedonicznej. Do jednej i do drugiej metody oceny sensorycznej przedstawiono tabele (10-12 i 13) opisujące precyzyjne kryteria dla poszczególnych metod. Dużą zaletą przeprowadzonych eksperymentów jest zrealizowany przez Doktorantkę zamiar weryfikacji hipotez i uzyskanych wyników, poszczególnych grup eksperymentów, analizą statystyczną z wykorzystaniem odpowiedniego narzędzia jakim jest program Statistica 13.3. Zastosowanie dwuczynnikowej analizy wariancji i sprawdzenie istotności różnic między wartościami średnimi na poziomie istotności $p \leq 0.05$ testem Duncana dla tak przeprowadzonych badań jest właściwe. Zakres zastosowanych metod analitycznych uważam za właściwy i wystarczający. Rozdział ten jest opisany w sposób czytelny i komunikatywny. Opisane i zastosowane metody analityczne mają potwierdzenie literaturowe. Główną częścią recenzowanej dysertacji jest zawierający ponad 100 stron rozdział 6 zatytułowany „WYNIKI i DYSKUSJA”. Struktura tego rozdziału jest podobna dla każdego z omawianych przez Autorkę produktów fermentowanych wzbogaconych o olej z lnicznika siewnego, orzechów włoskich czy hydrolizowany olej orzecha włoskiego. Szczegółowe opisy charakteryzujące gotowy produkt dotyczą podstawowego składu chemicznego, kwasowości miareczkowej i pH, analizy mikrobiologicznej, tekstury czy zawartości kwasów tłuszczowych. Wszystkie opisane cechy produktów zostały udokumentowane w czytelnych tabelach zawierających wartości średnie z pomiarów z podaną wartością błędu standardowego. Każda część zawiera również tabele wyników analizy statystycznej, co świadczy o umiejętności posługiwania się przez Autorkę tym narzędziem, które wspomaga warsztat nowoczesnego naukowca i pomaga wyciągać właściwe wnioski. Na podkreślenie zasługuje fakt wykonania bardzo dużej ilości analiz mikrobiologicznych które są bardzo czasochłonne. Z punktu widzenia konsumenta istotne są zmierzone informacje o liczebności bakterii wchodzących w skład zastosowanych szczepionek, w szczególności po 14 dniowym okresie przechowywania otrzymanych produktów. Ważną informacją jest fakt np. że dodatek zastosowanych olejów do kefirów wpływa pozytywnie na rozwój drożdży natomiast dodatek zhydrolizowanego oleju z orzecha do jogurtu korzystnie wpływa na przeżywalność zastosowanych gatunków drobnoustrojów. Pozwala to przypuszczać, że pomimo znaczącej modyfikacji składu produkty będą zachowywały swoje właściwości prozdrowotne wynikające z obecności pozytywnej dla

organizmu człowieka mikroflory. Równie cenne w tej części pracy są opisy charakteryzujące profile kwasów tłuszczowych. Przeprowadzona znaczna ilość analiz wskazuje na zdobycie wiedzy przez Doktorantkę w tym zakresie. W pracy potwierdzono obecność w produktach naturalnych kwasów tłuszczowych posiadających właściwości prozdrowotne. Interesującym wnioskiem wynikającym z analiz kefirów jest brak biosyntezy sprzężonego kwasu linolowego (CLA) przy zastosowaniu szczepionki, w skład której wchodzi ziarna kefirowe. Wzbogacenie natomiast kefiru probiotycznego o olej z orzecha włoskiego pozwoliło na zwiększenie ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co może stanowić wartość dodaną takiego produktu. Bardzo praktyczną informacją, z punktu widzenia technologicznego i zdrowotnego którą uzyskała Doktorantka jest fakt, że dodatek oleju z orzecha włoskiego do jogurtów może wpływać na profil kwasów tłuszczowych. Drobnoustroje stanowiące probiotyczną szczepionkę jogurtową są w stanie w czasie fermentacji zwiększyć zawartość kwasu oleinowego, wakcenenowego i CLA odpowiednio o około 4,7%, 9% i 6,2%. Również zastosowanie zhydrolizowanego przez lipazę z *Candida rugosa* oleju pozwoliło wykorzystać drobnoustrojom wolny kwas linolowy i zwiększyć zawartość CLA w probiotycznym jogurcie.

Z praktycznego punktu widzenia bardzo wartościowe jest przeprowadzanie i opisanie dla każdego produktu oceny sensorycznej, która wyszczególnia cechy sensoryczne nowych produktów i informuje o preferencjach konsumentów. Taka analiza jest dodatkowym argumentem podczas ewentualnych rozmów dotyczących wdrożenia, w warunkach przemysłowych, nowego produktu zawierającego dodatek prozdrowotnego oleju czy jego hydrolizatu. Analiza sensoryczna przeprowadzona przez Doktorantkę pozwala przypuszczać, że smak jogurtów do których dodano olej z orzecha włoskiego (zhydrolizowany bądź nie) może być zaakceptowany przez konsumentów w nowo tworzonych produktach. Całość pracy podsumowują wnioski, które oddają istotę przeprowadzonych badań i są odpowiedzią na założone hipotezy badawcze. Przedstawiona do oceny dysertacja napisana jest napisana w języku polskim, w stylu właściwym dla tego typu prac.

Podsumowując ten rozdział pod względem merytorycznym należy również zaznaczyć, że Autorka podjęła dyskusję wyników i w każdej części odnosiła uzyskane wyniki do wyników badań prowadzonych przez innych autorów. Przedstawione w pracy bogate piśmiennictwo, jak również ilość uzyskanych wyników i ich interpretacja świadczą o pracowitości i dojrzałości naukowej Pani mgr inż. Katarzyny Turek.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę dotyczącą sposobu opisu wyników badań. Korzystniejsze było by wstawienie do opisu tabel liczb, które informowały by o zauważonych przez autorkę tendencjach. Przykładem są przytoczone poniżej dwa zdania ze stron 94 i 111. **Zdanie 1:** „W badaniach własnych w wyniku przechowywania kefirów bez dodatku oleju, oraz z jego niższym udziałem zaobserwowano niewielkie zmniejszenie zawartości tego kwasu tłuszczowego, natomiast w produktach z 2% dodatkiem tłuszczu roślinnego, zaobserwowano istotne zwiększenie ilości kwasu oleinowego (tab. 24)”. Jak należy interpretować zastosowane określenia: zmniejszenie i istotne zwiększenie? **Zdanie 2:** „W przypadku zwięzłości jogurtów probiotycznych, zaobserwowano zmianę wartości tego parametru w czasie przechowywania, objawiającą się jej zmniejszeniem w produktach bez dodatku oleju roślinnego, oraz znacznym wzrostem wartości tego parametru w produktach z 0,03% dodatkiem oleju roślinnego. Zarówno jogurty świeże jak i przechowywane, charakteryzowały się podobną konsystencją (tab. 38)”. Inaczej to zdanie wyglądało by gdyby podana została informacja, że zwięzłość jogurtu zmniejszyła się o 21,31 [N] dla jogurtu bez dodatku oleju i zwiększyła o 215,73 [N] dla jogurtu z dodatkiem 0,03% oleju. Myślę, że również dla przejrzystości wyników tabelę 38 po przeliczeniu można by było zastąpić wykresem słupkowym który lepiej zilustrowałby wpływ czasu chłodniczego przechowywania na wartości parametrów tekstury.

Mimo wskazania w recenzji drobnych uwag polemicznych, które nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej praca jest ciekawa i oryginalna. Drobne niedociągnięcia, które wskazano w recenzji warto było by uwzględnić, przygotowując wyniki do druku w renomowanych czasopismach naukowych. Wartość naukowa tych wyników do tego upoważnia.

Reasumując można stwierdzić, że recenzowana praca doktorska zawiera prawidłowo przeprowadzony proces badawczy z właściwie wyciągniętymi wnioskami. Autorka wykazała umiejętność identyfikacji problemów badawczych, formułowania celu badań, pracy nad badaniami literaturowymi analizowanych problemów, doboru metod badawczych, właściwego przeprowadzenia badań oraz konstruowania wniosków. Wartość poznawcza i aplikacyjna ocenianej rozprawy doktorskiej jest wysoka. Godny podkreślenia jest fakt, że Doktorantka umiejętnie połączyła wiedzę z różnych dziedzin technologii żywności: mikrobiologii, analizy chemicznej kwasów tłuszczowych i oceny sensorycznej. Uzyskane wyniki dają podstawy do podjęcia prac nad zwiększeniem skali i wdrożeniem, w warunkach przemysłowych fermentowanych produktów z dodatkiem oleju z orzecha włoskiego.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wartość naukową pracy i zawarte w niej elementy nowości, a także zakres wykonanych badań stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Turek pt. „Wpływ dodatku olejów roślinnych na powstawanie bioaktywnych kwasów tłuszczowych w mleku fermentowanym” spełnia wszystkie wymagania stawiane tego typu opracowaniom zawartym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowy oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. Nr.65 poz. 595, z p. zm.).

Zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Technologii żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Turek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosuję również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Turek.

