

dr hab. inż. Agnieszka Filipiak-Florkiewicz, prof. UR
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Wydział Technologii Żywności
Katedra Technologii Gastronomicznej i Konsumpcji

Kraków, 02 listopada 2016 roku

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Magdy Filipczak-Fiutak
pt. „Wpływ kultury starterowej na cechy jakościowe kefirów z mleka różnych gatunków zwierząt”
wykonanej w Katedrze Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie,
pod kierunkiem dr hab. inż. Moniki Wszolek, prof. UR

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Prodziekana ds. Dydaktycznych i Studenckich Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie z dnia 18.11.2016 r., (DTŻ 520-27-314/2016).

Według Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa, Światowej Organizacji Zdrowia oraz Międzynarodowej Federacji Mleczarskiej mleczne napoje fermentowane to produkty powstałe z mleka pełnego, częściowo odtłuszczonego lub całkowicie pozbawione tłuszczu, bądź też otrzymane z odtworzonego z mleka w proszku, poddane fermentacji przez specyficzne mikroorganizmy, które fermentując laktozę, obniżają pH mleka i powodują jego koagulację. Wśród mlecznych napojów wyróżnić można m.in.: mleko, mleko acidofilne, jogurt, kefir, kumys.

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny wzrost produkcji mlecznych napojów fermentowanych należących do żywności funkcjonalnej. Coraz więcej pojawia się na rynku napojów mlecznych z udziałem probiotyków, a także wytworzonych z udziałem kultur zagęszczających.

Kefir produkowany jest z mleka przy udziale ziaren kefirowych lub szczepionek. Dzięki symbiotycznej działalności bakterii i drożdży obecnych w ziarnach i szczepionkach kefirowych prowadzona jest fermentacja mlekowa, alkoholowa, octowa i cytrynianowa. Wiele tworzących się w tych przemianach metabolitów wpływa na charakterystyczne cechy organoleptyczne i reologiczne kefiru. Dokonując wyboru produktu, konsumenci zwracają coraz większą uwagę na jego właściwości zdrowotne, a nie tylko na walory smakowo-zapachowe. Do cennych prozdrowotnych cech kefiru zaliczyć można m.in. właściwości probiotyczne, hipocholesterolemiczne i antymutagenne, a także stymulacje układu immunologicznego.

Najczęściej do produkcji napojów fermentowanych (w tym kefiru) wykorzystywane jest mleko krowie. Jednak coraz większym zainteresowaniem na świecie, cieszy się mleko innych

zwierząt. Obserwuje się m.in. wzrost popularności mleka koziego i jego przetworów ze względu na ich walory żywieniowe. Mleczne napoje fermentowane z mleka koziego zachowują jego wszystkie zalety, a są dodatkowo wzbogacone mikroflorą, dzięki której dochodzi do przefermentowania laktozy. Na uwagę zasługuje także mleko ośle, którego skład pod wieloma względami zbliżony jest mleka do kobiecego, co powoduje, że jest ono wykorzystywane w żywieniu niemowląt bądź w diecie osób z rozpoznaną nietolerancją innych gatunków mleka. Obecnie w niektórych krajach europejskich, można kupić mleko ośle, przeznaczone głównie dla noworodków cierpiących z powodu alergii na mleko krowie (CMPA - *cow's milk protein allergy*) oraz dla osób starszych i rekonwalescentów.

Mając powyższe na uwadze, podjęcie przez mgr Magdę Filipczak-Fiutak badań mających na celu określenie wpływu kultury starterowej na cechy jakościowe kefirów wyprodukowanych z mleka różnych gatunków zwierząt, należy uznać za jak najbardziej uzasadnione.

W ocenie przedłożonej pracy zwracałam uwagę przede wszystkim na jej wartość merytoryczną tj. zasadność celu pracy oraz jego uzasadnienie, metodologię badań, umiejętność interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników, a także wnioskowania. W następnej kolejności oceniałam stronę formalną dysertacji.

Ocena poprawności sformułowania celu pracy oraz jego uzasadnienia

Celem pracy było wykorzystanie mleka oślego jako surowca do produkcji kefirów oraz określenie wpływu poszczególnych rodzajów kultur starterowych na cechy otrzymanych produktów. Jednocześnie określono wpływ rodzaju wykorzystanych kultur starterowych, gatunku mleka oraz czasu chłodniczego przechowywania na cechy jakościowe, liczbę charakterystycznych grup drobnoustrojów, teksturę i ocenę organoleptyczną kefirów.

Zakres pracy obejmował dokładną charakterystykę wykorzystanych surowców oraz produkcję w warunkach laboratoryjnych kefirów metodą termostatową z wykorzystaniem trzech gatunków mleka (krowie, kozie i ośle) i trzech rodzajów kultur starterowych (tradycyjne ziarna kefirowe o nazwie *Grzybek Tybetański*, ziarna kefirowe firmy Danisco oraz liofilizowaną kulturę kefirową typu DVS), a następnie ocenę otrzymanego mleka fermentowanego w 1, 14 i 28-dniu po produkcji.

Na uznanie zasługuje fakt, że Doktorantka szczegółowo zdefiniowała problemy badawcze i zdefiniowała hipotezy (4), a nie tylko lakonicznie określiła cel pracy.

Cel pracy poprzedzono bardzo obszernym (zamieszczonym na 51 stronach przeglądem piśmiennictwa), który przejrzyście i szczegółowo przedstawia podstawy naukowe rozprawy. Doktorantka scharakteryzowała skład i właściwości mleka różnych gatunków zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem mleka oślego. Autorka następnie omówiła historię, właściwości fizyko-chemiczne i mikroflorę ziaren kefirowych.

Zgodnie z przyjętym celem pracy, Doktorantka znaczną uwagę poświęciła charakterystyce kefiru. Wartościowym elementem przeglądu piśmiennictwa jest opis synergistycznego działania bakterii i drożdży oraz charakterystyka właściwości funkcjonalnych kefiru.

W ocenie szczegółowej tej części pracy, zwracam uwagę na następujące aspekty:

- zdanie: „*Białko mleka charakteryzuje się zawartością wszystkich niezbędnych aminokwasów, w tym aminokwasów egzogennych ...*” wymaga przeredagowania. Aminokwasy niezbędne to właśnie aminokwasy egzogenne;

- nie można zgodzić się ze sformułowaniami „*Mleko krowie jest także źródłem witamin: A, D, E, K, C i B₂*” i „*Wartość odżywcza kefiru wiąże się ze składnikami chemicznymi takimi jak witaminy (B₁, B₂, B₅, B₆, B₁₂ oraz C)*”. Mleko czy kefir pomimo wysokiej wartości odżywczej nie mogą być bowiem uznane za źródło witaminy C;

- na podstawie literatury z lat 90. ubiegłego wieku (Fesnak i Fetiński 1996, Libudzisz i Piątkiewicz 1990; Serova 1997) nie powinno się opisywać sytuacji rynkowej dotyczącej dostępności w sprzedaży żywych ziaren kefirowych czy danych statystycznych dotyczących spożycia kefirów (str. 35);

- w opisie właściwości funkcjonalnych i wartości żywieniowej kefiru celowe wydaje się być podanie klasycznej definicji żywności funkcjonalnej;

- w opisie celu i zakresu pracy powinno być przeredagowane zdanie: „*Jednocześnie określenie wpływu rodzaju wykorzystanych kultur starterowych, gatunku mleka oraz czasu chłodniczego przechowywania na cechy jakościowe, liczbę charakterystycznych grup drobnoustrojów, teksturę i ocenę organoleptyczną kefirów.*”;

- proponuję unikać sformułowań typu: „*wzrost wagi*”, „*literatura donosi*”, „*dane literaturowe podają*”.

Ocena metodologii badań

W pierwszym podrozdziale tej części pracy mgr Magda Filipczak-Fiutak scharakteryzowała materiał doświadczalny oraz przedstawiła organizację badań. Następnie Autorka przedstawiła szczegółowo metody badań. Doktorantka opisała analizę chromatograficzną profilu kwasów tłuszczowych, elektroforetyczny rozkład białek, a także metodę oznaczania frakcji białkowych mleka. Następnie szczegółowo została przedstawiona metodyka badań mikrobiologicznych. Charakterystykę wykonanych oznaczeń kończy opis analiz, jakim poddano wyprodukowane kefir (w tym ocenę organoleptyczną i badanie tekstury). Ostatni podrozdział przedstawia zastosowane metody statystycznej analizy wyników.

W mojej opinii dobór metod był właściwy w stosunku do założonego celu, zarówno w części technologicznej, jak i w zakresie analiz chemicznych. Na podkreślenie zasługuje przeprowadzenie przez Doktorantkę analiz dotyczących charakterystyki frakcji białkowych, co umożliwiło ocenę potencjalnych właściwości alergicznych mleka oślego i kefirów.

W tej części pracy nasuwają się następujące spostrzeżenia i pytania:

- korzystne byłoby podanie liczebności stada, od którego pozyskano mleko;

- jaką ilość mleka pozyskiwano i poddawano analizom oraz jaką ilość przeznaczono do produkcji kefiru?

- dlaczego stosowano odmienne parametry procesu pasteryzacji mleka krowiego, koziego i oślego?

- czy mam rozumieć, że w ocenie organoleptycznej produktu ocenę ogólną stanowiła suma iloczynów punktów przyznanych za każdy wyróżnik przez przypisany mu współczynnik ważkości, a nie ilorazów?

Ocena prezentacji, interpretacji i dyskusji wyników

Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki w sposób przejrzysty i na ogół właściwie je zinterpretowała. Warto podkreślić, że analiza uzyskanych rezultatów została przeprowadzona bardzo wnikliwie i starannie.

Pierwsze podrozdziały tej części pracy przedstawiają wyniki dotyczące składu podstawowego, charakterystyki frakcji białkowych, profilu kwasów tłuszczowych oraz jakości mikrobiologicznej mleka oślego, koziego oraz krowiego. Doktorantka wykazała, że mleko ośle charakteryzuje się istotnie różnym składem podstawowym w porównaniu z mlekiem krowim i kozim, jak również największym procentowym udziałem lizozymu. Tłuszcz mleka oślego odznaczał się dużym udziałem kwasu linolowego i linolenowego, ważnych z żywieniowego punktu widzenia. Ponadto, pomimo mniejszej zawartości suchej masy, mleko ośle było lepszym środowiskiem do rozwoju charakterystycznych grup drobnoustrojów pochodzących z kultur kefirowych. Ważnym stwierdzeniem jest fakt, że ze względu na wysoką jakość mikrobiologiczną, ten rodzaj mleka może być przeznaczony do konsumpcji po pasteryzacji w niższych temperaturach, i tym samym kwalifikować się jako produkt o niskim stopniu przetworzenia.

W dalszej kolejności mgr Magda Filipczak-Fiutak opisała wyniki badań dotyczących kefirów, przedstawiając ich właściwości fizyko-chemiczne, liczebność charakterystycznych drobnoustrojów, metabolity powstałe w procesie fermentacji, teksturę oraz ocenę organoleptyczną – zarówno po 1, jak i 14 oraz 28 dniach chłodniczego przechowywania.

Cennym - z poznawczego punktu widzenia - jest opis zmian proteolitycznych w kefirach. Doktorantka wykazała, że β -laktoglobulina (β -LG) mleka oślego podatna była na proteolizę pod wpływem wykorzystanych kultur starterowych. Nie stwierdziła natomiast istotnego wpływu ziaren kefirowych, ani kultury DVS na jej procentowy udział w stosunku do wszystkich białek mleka w kefirach z mleka krowiego i koziego. W odróżnieniu od produktów z mleka przeżuwaczy, w kefirach z mleka oślego stwierdzono zmniejszenie procentowego udziału białek o masie odpowiadającej β -LG. Zmiany te zachodziły najintensywniej w produktach otrzymanych z wykorzystaniem ziaren kefirowych. Spostrzeżenie to jest tym bardziej istotne, że β -LG jest uznawana za jeden z ważniejszych alergenów mleka. Ponadto Autorka zaobserwowała, że ziarna kefirowe wykorzystane do produkcji kefirów, powodowały większy stopień proteolizy frakcji kazeinowych w porównaniu z liofilizowaną kulturą DVS. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że mleko ośle może być wykorzystane jako surowiec do produkcji kefirów

akceptowanych przez potencjalnych konsumentów, a także stanowić alternatywę dla osób ze stwierdzoną nietolerancją białek innych gatunków mleka. W kefirach z mleka oślego produkowanych z wykorzystaniem ziaren kefirowych, liczba pałeczek mlekowych nie zmniejszała się w czasie przechowywania, czego nie zaobserwowano w kefirach z liofilizowaną kulturą DVS z tego samego gatunku mleka. Dowodzi to, że większa liczba bakterii kwasu mlekowego, ale dodawana w postaci czystych kultur, charakteryzowała się mniejszą przeżywalnością w czasie przechowywania.

Tymczasem użycie ziaren do produkcji kefiru gwarantowało otrzymanie produktu spełniającego zalecenia dotyczące liczby drożdży zawarte w Codex Alimentarius.

Analizując teksturę oraz jakość organoleptyczną kefirów, mgr Magda Filipczak-Fiutak stwierdziła, że największą twardością i siłą ekstruzji charakteryzowały się kefiry z mleka krowiego, szczególnie produkowane z wykorzystaniem ziaren kefirowych. Natomiast na parametry tekstury kefirów z mleka koziego decydujący wpływ miał rodzaj surowca a nie kultura. Ponadto, kefiry z mleka oślego, pomimo, że nie uzyskały konsystencji charakterystycznej dla tego rodzaju mleka fermentowanego, zostały dobrze ocenione. Ich ogólna ocena organoleptyczna była wyższa od przyznanej produktom z mleka koziego. Ważnym, z aplikacyjnego punktu widzenia, stwierdzeniem było, że chociaż wyprodukowanie kefirów z mleka oślego jest możliwe, to z uwagi na ich płynną konsystencję, w przyszłości należałoby podjąć badania mające na celu poprawę tej cechy.

Oceniając rozdział „Wyniki i dyskusja” należy podkreślić skrupulatny opis uzyskanych rezultatów oraz obszerną, wnikliwą i bardzo szczegółową dyskusję. Autorka w tej części pracy porównuje wprawdzie uzyskane rezultaty z pracami innych badaczy, ale bardziej koncentruje się na ocenie przyczyn, mechanizmów i stwierdzonych zależności. Świadczy to o doskonałej znajomości tematu i dojrzałości naukowej.

Oceniając niniejsze rozdziały, nasuwają się następujące spostrzeżenia i pytania:

- zachowanie kolejności przedstawiania i omawiania wyników zgodnie z sekwencją opisaną w rozdziale „Materiał i metody badań” wpłynęłoby pozytywnie na przejrzystość tej części pracy;
- zastosowanie czasu przeszłego do omawiania wyników byłoby bardziej właściwe;
- oznaczenia literowe w tabelach w celu zaznaczenia różnic istotnych statystycznie powinny następować po wyniku, a nie wartości odchylenia standardowego. Uwaga ta dotyczy także podawania jednostek w tekście pracy;
- zdanie *„Laktoza poprawia wchłanianie wapnia, fosforu, magnezu i baru w przewodzie pokarmowym, co ma wpływ na mineralizację kości u noworodków”* powinno być w mojej ocenie przereklamowane. W tej postaci sugeruje pozytywne działanie ww. pierwiastków podczas gdy bar wpływa negatywnie na mineralizację kości – hamując ją;
- czy nie było możliwe przedstawienie procentowego udziału frakcji białkowych mleka krowiego, gdy był przeprowadzony elektroforetyczny rozdział białek tego mleka?;
- wykorzystanie publikacji z lat 90. XX wieku powinno być w rozdziale „Wyniki i dyskusja” ograniczone tylko do najważniejszych kwestii. Dla przykładu w pracy Autorka napisała *„Park*

[1994], a także Jandal [1996] twierdzą, że mleko kozie zalecane jest przez lekarzy dzieciom wrażliwym na mleko krowie, a także jako alternatywę dla osób ze stwierdzoną alergią na mleko krowie”;

- szerszego komentarza w mojej opinii wymagają wyniki dotyczące kwasowości miareczkowej kefirów z mleka oślego – nie spełniały one bowiem wymagań dla kefirów;
- zalecałabym podawanie jednostek siły, zgodnie z układem SI;
- sugeruję ograniczanie sformułowań typu „dla mleka”; „przyrost wagi” „autorzy oznaczyli jako nieobecne”, „przyrosty egzopolisacharydów”;
- rozpoczynanie zdania od „Wg” nie jest odpowiednie;
- skrót tj. oznacza to „jest” i nie powinien być stosowany do określenia „takie jak”.

Ocena wnioskowania

Wnioski w sposób przejrzysty przedstawiają najważniejsze rezultaty badań w kontekście założonego celu. Na podstawie otrzymanych wyników sformułowano 13 wniosków, które oprócz stwierdzeń wskazują także na ewentualne możliwości zastosowania mleka oślego do produkcji kefirów.

Ocena wykorzystanej bibliografii

W pracy skorzystano z 323 pozycji literatury (53 publikacje z ostatnich 5 lat), z czego większość stanowiły publikacje w języku angielskim. Większość literatury to oryginalne prace twórcze. Na uwagę zasługuje trafny dobór źródeł. W opinii recenzenta niepotrzebnie jednak zacytowano tak wiele pozycji opublikowanych w ubiegłym wieku (ponad 80 prac).

Ocena formalna pracy

Formalny układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich o charakterze doświadczalnym. Oceniana praca obejmuje 188 stron maszynopisu i składa się z 14 rozdziałów, w tym streszczenia, zarówno w języku polskim, jak i angielskim. Kolejność rozdziałów i podrozdziałów jest logiczna. Nazewnictwo podrozdziałów, szczególnie w części dotyczącej przeglądu literatury należałoby zmienić. Sformułowane tytuły podrozdziałów typu „Wpływ na cholesterol” czy „Gojenie się ran” nie mogą być uznane za odpowiednie.

W pracy zamieszczono 22 tabele (w tym 9 w aneksie), 15 rysunków i 2 zdjęcia. Praca jest przygotowana starannie.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi bardzo wartościowe opracowanie naukowe, świadczące o doskonałym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym Doktorantki. Autorka

uzyskała wiele wartościowych wyników. Na wyróżnienie zasługuje rzetelna ocena właściwości i możliwości wykorzystania mleka oślego do produkcji kefirów nie tylko pod kątem technologicznym, ale także w aspekcie zdrowotnym.

Na uznanie zasługuje również bardzo obszerna, dojrzała i wnikliwa dyskusja, która nie tylko dotyczy porównania uzyskanych rezultatów z wynikami innymi autorów, a przede wszystkim koncentruje się na próbie wyjaśnienia wykazanych zależności. Wyróżnić należy także potencjalny aspekt aplikacyjny pracy.

Nieliczne uwagi/spostrzeżenia zawarte w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy.

Stwierdzam, że praca Pani mgr Magdy Filipczak-Fiutak odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) oraz § 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie mgr Magdy Filipczak-Fiutak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy proponuję wyróżnić dysertację doktorską Pani Mgr Magdy Filipczak-Fiutak.

Magdalena Filipczak-Fiutak