

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Kowalczyk

pt. „Wpływ dodatku błonnika i różnych szczepów probiotycznych na przeżywalność bakterii, biodostępność makroelementów oraz jakość lodów z mleka owczego” wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Agaty Znamirowskiej-Piotrowskiej, prof. UR (Promotor) oraz dr inż. Małgorzaty Pawłós (Promotor pomocniczy) w Zakładzie Technologii Mleczarstwa, Instytutu Technologii Żywności i Żywnienia, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Rzeszowskiego

Podstawa wykonania recenzji:

Uchwała nr 40/12/2024 Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 9 grudnia 2024 r., podjęta na podstawie art. 192 ust. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 poz. 742 z późn. zm.)

Pismo Prorektora ds. Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego, dr hab. Józefa Cebulskiego, prof. UR, nr CN/167/2024/Z

1. Ocena znaczenia podjętej tematyki badawczej

Wyniki najnowszych badań w coraz większym zakresie wskazują na znaczenie mikrobioty jelitowej jako czynnika mającego decydujący wpływ na zdrowie człowieka. Przedstawiane są dowody na związek między stanem ilościowym i jakościowym tej mikrobioty a przebiegiem wielu procesów oddziaływujących nie tylko na stan zdrowia fizycznego, ale także na psychikę człowieka. Dlatego nieustannie prowadzone są badania nad możliwością modyfikacji mikrobioty jelitowej poprzez odpowiednio dobrane, a w niedalekiej przyszłości zapewne spersonalizowane kultury probiotyczne. Rysuje się zatem ciągle potrzeba opracowywania i badania nowych produktów żywnościowych mogących być nośnikami tego typu drobnoustrojów. Przyjmowanie probiotyków w żywności jest naturalniejszym i korzystniejszym pod względem zdrowotnym sposobem niż przyjmowanie suplementów diety. Umożliwia ono dostarczenie konsumentowi poza probiotykami także innych składników odżywczych o charakterze funkcjonalnym takich jak białka, składniki mineralne, błonnik i witaminy. W przypadku produktów zawierających probiotyki kluczowa jest ich przeżywalność - zarówno w samym wyrobie jak również w trakcie pasażu jelitowego. Równie istotna jest przyswajalność zawartych w tych wyrobach składników odżywczych – niezbędna do pełnego wykorzystania potencjału prozdrowotnego funkcjonalnego produktu żywnościowego. Obie te kwestie są przedmiotem badań w ocenianej dysertacji, co jednoznacznie wskazuje na jej duże znaczenie naukowe. Kolejnym bardzo ważnym aspektem podejmowanych przez Doktorantkę badań jest wykorzystanie mleka owczego do produkcji lodów. Mleko to charakteryzuje się szczególnie korzystnym składem zarówno pod względem żywieniowym jak i dla jego przydatności technologicznej. Powszechnie znana jest szczególnie wysoka, w porównaniu z mlekiem krowim, zawartość białka i tłuszczu. Oba te składniki mają kluczowe znaczenie w produkcji serów, stąd od wieków z mleka owczego produkowano sery. Jednakże zawartość białka i tłuszczu jest równie istotna w kształtowaniu jakości lodów – umożliwia ograniczenie lub wręcz pominięcie stosowania dodatków zwiększających suchą masę mleka, takich jak mleko w proszku, śmietanka oraz substancje stabilizujące i emulgujące. W efekcie można uzyskać produkt o pożądanym obecnie przez konsumentów tzw. prostym składzie, zawierający stosunkowo

niskoprzetworzone składniki spożywcze. Wysoka wartość naukowa dysertacji wynika ponadto z szerokiego materiału badawczego i całościowego podejścia do oceny będących przedmiotem badań produktów. Polegało ono na zastosowaniu różnych szczepów probiotycznych w połączeniu ze składnikami o charakterze prebiotycznym do produkcji lodów z mleka owczego oraz na ich kompleksowej analizie obejmującej parametry mikrobiologiczne, fizykochemiczne i organoleptyczne.

Oceniając szerzej problematykę badawczą będącą treścią dysertacji warto także wskazać aspekty aplikacyjne o charakterze nie tylko żywieniowym, ale nawet środowiskowym, ekonomicznym czy społeczno-kulturowym. Omówione wyżej względy żywieniowe mają jeszcze większe znaczenie, jeśli weźmie się pod uwagę możliwość potencjalnego wzrostu zainteresowania i spożycia produktów z mleka owczego poprzez pojawienie się nowego, z jednej strony funkcjonalnego, a z drugiej bardzo atrakcyjnego sensorycznie wyrobu, co może dotyczyć szczególnie konsumentów w młodym wieku, którzy dotychczas nie byli zainteresowani typowymi produktami owczymi takimi jak sery wędzone. Istotny jest także fakt sezonowego dostępu do mleka owczego - z jednej strony będzie to determinować sezonowość produkcji lodów z tego surowca (zbieżną z okresem największego popytu na te wyroby), ale z drugiej strony, gdy weźmie się pod uwagę trwałość oraz zastosuje odpowiednią logistykę produkcji i dystrybucji tego typu produktów, może to zapewnić ich całoroczną podaż. Produkcja mleka owczego nierozłącznie związana jest z pasterstwem. Potencjalne zwiększenie popytu na ten surowiec może być także korzystne pod względem środowiskowym, społeczno-kulturowym i ekonomicznym w rejonach górskich, gdzie trudno prowadzić innego rodzaju gospodarkę rolną.

Podsumowując uważam, że problematyka badawcza podejmowana w dysertacji doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Kowalczyk jest istotna dla rozwoju dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia. Ponadto należy wskazać także na aspekt aplikacyjny niniejszego opracowania, co jest zgodne z aktualnymi trendami wskazującymi na konieczność większego zaangażowania nauki w rozwiązywanie bieżących problemów branży spożywczej.

2. Ocena formalnej strony pracy

Przedstawiona przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk praca stanowi zbiór czterech spójnych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2021-2023 w angielskojęzycznych, indeksowanych przez *Journal Citation Report* czasopismach naukowych, znajdujących się także w wykazie czasopism MNiSW:

1. **Kowalczyk, M.;** Znamirska, A.; Buniowska, M. Probiotic Sheep Milk Ice Cream with Inulin and Apple Fiber. *Foods* **2021**, *10*(3), 678; <https://doi.org/10.3390/foods10030678>
2. **Kowalczyk, M.;** Znamirska, A.; Pawlos, M.; Buniowska, M. The Use of Olkusa Sheep Milk for the Production of Symbiotic Dairy Ice Cream. *Animals* **2022**, *12*, 70. <https://doi.org/10.3390/ani12010070>.
3. **Kowalczyk, M.;** Znamirska-Piotrowska, A.; Buniowska-Olejek, M.; Pawlos, M. Sheep Milk Symbiotic Ice Cream: Effect of Inulin and Apple Fiber on the Survival of Five Probiotic Bacterial Strains during Simulated In Vitro Digestion Conditions. *Nutrients* **2022**, *14*, 4454. <https://doi.org/10.3390/nu14214454>.
4. **Kowalczyk, M.;** Znamirska-Piotrowska, A.; Buniowska-Olejek, M.; Zagula, G.; Pawlos, M. Bioavailability of Macroelements from Synbiotic Sheep's Milk Ice Cream. *Nutrients* **2023**, *15*, 3230. <https://doi.org/10.3390/nu15143230>.

Sumaryczny wskaźnik *Impact Factor* powyższych publikacji wynosi 20,361 zaś łączna liczba punktów według list czasopism zawartych w wykazie MEiN/MNiSW wynosi 480 pkt. Wartości te należy uznać za

wysokie i w pełni wystarczające do ubiegania się o stopień naukowy doktora. Warto zauważyć także, że mimo stosunkowo krótkiego okresu od ich opublikowania, według baz Web of Science oraz Scopus publikacje wchodzące w zakres dysertacji były cytowane odpowiednio 31 i 39 razy, co świadczy o ich wysokiej jakości naukowej.

Wszystkie zawarte w dysertacji publikacje to oryginalne eksperymentalne prace badawcze, będące wynikiem pracy zespołowej, w których liczba autorów wynosi od 3 do 5. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem, co jednoznacznie wskazuje na jej wiodącą rolę w procesie twórczym. Potwierdzeniem tego są załączone do dysertacji oświadczenia wszystkich Współautorek, określające indywidualny wkład każdej z nich w wykonaną pracę zbiorową. Doktorantka aktywnie uczestniczyła w zbieraniu literatury, opracowaniu koncepcji badań, doborze i walidacji metod badawczych, wykonaniu badań, analizie wyników, przygotowaniu pierwszych i ostatecznych wersji manuskryptu oraz pozyskiwaniu finansowania na opublikowanie artykułu. Załączone dokumenty świadczą o tym, że wszystkie Współautorki akceptują zadeklarowany przez Doktorantkę udział w procesie twórczym i wyrażają zgodę na przedłożenie przez nią powyższych publikacji jako części swojej rozprawy doktorskiej. Pomimo że w oświadczeniach nie wyszczególniono procentowego udziału każdej z Współautorek w powstaniu artykułów, to z całą pewnością można twierdzić, że rola Pani mgr inż. Magdaleny Kowalczyk była wiodącą w tworzeniu samodzielnej i wyodrębnionej części pracy zbiorowej w postaci przedstawionych w dysertacji publikacji, co potwierdza jej dobre przygotowanie do samodzielnej pracy naukowej.

Przedłożona do recenzji rozprawa stanowi zwięzły opis opublikowanych prac w układzie charakterystycznym dla opracowań naukowo-badawczych. We wstępnej części pracy znajduje się wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz wykaz skrótów w niej stosowanych. Zasadniczą częścią opracowania są rozdziały: Wstęp, Cel i hipotezy badawcze, Materiał i metody badawcze, Opis wyników i osiągnięć badawczych, Wnioski, Spis literatury, Spis wykresów i schematów. W dalszej części znajdują się streszczenia w języku polskim i angielskim oraz opis pozostałych osiągnięć naukowych Autorki. W aneksie do opracowania zawarto oryginalne teksty publikacji wchodzących w skład rozprawy a także oświadczenia Współautorek.

3. Ocena merytoryczna cyklu publikacji oraz całości pracy

Wstęp stanowi zwięzły przegląd literatury obejmujący najważniejsze zagadnienia dotyczące podejmowanej tematyki badawczej. W jego początkowej części Autorka wspomina o zróżnicowaniu geograficznym dotyczącym wielkości produkcji i znaczenia mleka owczego w różnych obszarach świata, zupełnie nie odnosząc się jednakże do realiów polskich, co - moim zdaniem - warto byłoby uzupełnić. W dalszej części tego rozdziału dokonana jest charakterystyka składu, właściwości fizykochemicznych i odżywczych mleka owczego, głównie w aspekcie jego wyższości w stosunku do mleka krowiego i koziego. W akapicie 2. na str. 8 dane dotyczące składu chemicznego mleka owczego należałoby raczej przedstawić w formie zakresów, a nie sztywnych wartości liczbowych, gdyż podobnie jak w wypadku mleka innych przeżuwaczy jest on mocno zróżnicowany w zależności od czynników genetycznych, żywieniowych, fizjologicznych i innych; tym bardziej, że jako materiał źródłowy tych danych wskazano cztery pozycje literatury. Dalej Autorka słusznie wskazuje na mleko owcze jako produkt o wysokich walorach odżywczych i zdrowotnych, wynikających głównie z wysokiej zawartości i profilu białek, tłuszczu i składników mineralnych oraz z zawartości szerokiej gamy składników bioaktywnych takich jak CLA, koenzym Q, witaminy A,D,E czy fosfolipidy. Można mieć jedynie uwagę do

określenia „kwasu orotowego”, które nie powinno mieć charakteru liczby mnogiej, gdyż jest to nazwa określonego związku chemicznego. Nie do końca czytelne są dane w wierszach 23-24 na str. 8, gdzie z jednej strony jest poprawna informacja o większej zawartości kazeiny w mleku owczym niż w krowim, a z drugiej - poparte jest to danymi liczbowymi w nawiasach, które wskazują na większy udział frakcji αs w mleku krowim niż owczym. Kolejnym wątkiem rozdziału Wstęp jest charakterystyka lodów. Autorka słusznie zauważa, że ich spożycie w Polsce jest znacząco niższe niż w wielu innych krajach Europy i świata, co daje potencjał do badań i prac wdrożeniowych w tym zakresie, szczególnie gdy bierze się pod uwagę opracowywanie i wdrażanie lodów o charakterze produktów funkcjonalnych. Można mieć jedynie uwagę do aktualności danych źródłowych, w oparciu o które formułowana jest teza o aktualnym spożyciu lodów - szczególnie kiedy po stwierdzeniu „W Polsce na przestrzeni ostatnich 10 lat konsumpcja lodów wzrosła z 3,5 do 4 litrów na osobę rocznie i nadal rośnie” cytuje się pozycje z 2015 i 2019 roku. Mam zatem prośbę o przedstawienie aktualnych wartości w tym temacie, choćby w oparciu o dane GUS. Zastrzeżenia można mieć także do stosowanego określenia, że w trakcie zamrażania następuje „...zagęszczanie mieszanki lodziarskiej poprzez usunięcie wody w postaci lodu”. Lód pozostaje przecież w matrycy lodowej gotowego produktu.

Dalsza część wstępu dotyczy żywności funkcjonalnej ze szczególnym uwzględnieniem segmentu opartego na probiotykach. Zdecydowanie przesadne jest stwierdzenie zawarte w ostatnim akapicie na str. 9, że „produkty na bazie mleka owczego...stanowią czołową pozycję w żywności funkcjonalnej...” - wynika to, niestety, choćby ze stosunkowo niewielkiej skali produkcji tego cennego surowca. Nie do końca zrozumiała jest teza zawarta w akapicie 2. na str. 10, że z mleka owczego możliwa jest produkcja lodów o większej gęstości, co chroni szczepy bakterii przed tlenem, tym bardziej, że nie zacytowano tu żadnego źródła literatury. Nie budzą wątpliwości dobrze przedstawione i poparte literaturą dane dotyczące korzystnego oddziaływania probiotyków na organizm ludzki. Autorka jednakże słusznie podkreśla konieczność wysokiej przeżywalności tego typu drobnoustrojów zarówno w produkcji jak i podczas trawienia w przewodzie pokarmowym. Podczas produkcji lodów do mieszanki wprowadzane jest powietrze, co stwarza ryzyko negatywnego oddziaływania na drobnoustroje beztlenowe, do których w większości zaliczają się bakterie probiotyczne. Stąd istnieje konieczność badań, w które wpisuje się niniejsza dysertacja. Słuszną podejmowaną przez Autorkę koncepcją jest także dodawanie do lodów błonnika pokarmowego, który z jednej strony ma korzystne właściwości technologiczne w tych produktach a z drugiej - częstokroć wykazuje właściwości prebiotyczne oraz prozdrowotne. Bardzo istotna jest niewątpliwie kwestia konieczności zwiększenia podaży tego składnika w diecie, gdyż obecnie jego spożycie jest znacznie niższe niż zalecane. Niefortunne pod względem językowym jest jedynie sformułowanie, że inulina jest 0,4-0,6 razy słodsza od sacharozy (str. 11, wiersz 33). Ostatnim ważnym zagadnieniem poruszonym we wstępie jest biodostępność składników mineralnych zawartych w żywności. Problematyka ta jest szczególnie istotna w produktach mlecznych, które są bogatym źródłem tych niezwykle istotnych pod względem odżywczym komponentów. Na podstawie danych literaturowych Autorka słusznie uzasadnia przyjętą w pracy koncepcję, że błonnik pokarmowy i probiotyki dodawane do produktów mogą ułatwić wchłanianie minerałów w przewodzie pokarmowym. Z obowiązku recenzenta wskazuję tylko na - omyłkowo zapewne - użycie określenia „*in vitro*” zamiast „*in vivo*”, gdyż to właśnie badania na organizmach żywych są problematyczne ze względu na wysokie koszty, długi czas ich trwania oraz kwestie etyczne. Podsumowując: uważam, że treść rozdziału Wstęp choć jest stosunkowo krótka, to w sposób całościowy i rzetelny uzasadnia podjętą w pracy tematykę badań.

Rozdział Cel i hipotezy badawcze podzielono na 3 podrozdziały. W pierwszym z nich sformułowano cel pracy, na który składa się cel główny oraz wynikające z niego założenia badawcze. Jako cel główny pracy przyjęto określenie możliwości zastosowania 5 różnych szczepów probiotycznych w produkcji lodów z mleka

owczego z dodatkiem inuliny i błonnika jabłkowego co sugeruje, że główny ciężar badań miał charakter technologiczny, dopiero w dalszej części opisano kluczowe, moim zdaniem, wątki badawcze dotyczące jakości lodów, przeżywalności drobnoustrojów czy biodostępności makroelementów. Osobiście uważam, że bardziej czytelne byłoby przedstawienie tych treści w formie wypunktowanej z jednoznacznym podziałem na cel główny i wynikające z niego cele szczegółowe poszczególnych etapów doświadczenia. Podobna uwaga dotyczy podpunktu drugiego, w którym określono zakres pracy; ponadto jego treść w znacznej części pokrywa się z treścią zawartą w podpunkcie 1 opisującym cel. Trzeba także zauważyć, że użyte w pracy stwierdzenie, że określano biodostępność makroelementów z lodów w przewodzie pokarmowym jest nieprecyzyjne, gdyż w rzeczywistości badania prowadzono metodą „*in vitro*”. W dalszej kolejności przedstawionych jest 7 hipotez badawczych. Hipotezy 1-3 dotyczą pierwszych dwóch publikacji z cyklu i każda z nich łączy w sobie części tych prac, co - moim zdaniem - jest nie do końca poprawnym podejściem, bowiem badania w publikacji 1. wykonywane były w innym czasie i na nieco odmiennym pod względem jakościowym surowcu. Niezrozumiałe jest także dlaczego hipoteza 1. dotyczy wyłącznie lodów z inuliną, skoro przedmiotem badań określonym w temacie były także lody z dodatkiem błonnika. W hipotezie 2. jest niefortunne określenie, że „czas przechowywania kształtuje cechy lodów”, Pojęcie „kształtowanie” to wpływanie na coś w celu osiągnięcia określonego efektu, a cechy lodów raczej samoistnie zmieniają się pod wpływem czasu. Ponadto, moim zdaniem, hipotezy mogłyby być sformułowane bardziej precyzyjnie w aspekcie zdefiniowania nie tylko samego wpływu badanych czynników na określone grupy parametrów, lecz także określenia kierunku oczekiwanych zmian mających konkretne znaczenie praktyczne.

W rozdziale „Materiał i zastosowane metody badawcze” zawarto szczegółowy opis materiału badawczego i zastosowanych do jego analizy metod badań, z przyporządkowaniem do określonych publikacji, w których miały one zastosowanie. Czytelność i zrozumienie przebiegu badań ułatwia zamieszczony w pracy całościowy schemat graficzny. Treść tego rozdziału jest przejrzysta i umożliwia całościowe zapoznanie się z przebiegiem doświadczeń opisanych w czterech oddzielnych publikacjach. Jednakże po jego lekturze nasuwa się kilka uwag i pytań. W wykazie materiału badawczego zabrakło informacji nt. esencji smakowych, które stosowano do produkcji lodów opisanych w publikacjach 1 i 2, co jest o tyle istotne, że produkty te poddawano ocenie organoleptycznej. Nieścisłe są także dane odnośnie parametrów obróbki termicznej mleka i mieszanek lodowych, w dysertacji widnieje pasteryzacja mleka 85 °C/30 min i pasteryzacja mieszanki na lody w temp. 85 °C bez podania czasu, natomiast w publikacjach 1, 2 i 3 nie ma informacji o pasteryzacji mleka, natomiast pasteryzacja mieszanki przebiegała w 85 °C i czasie 30 min (publ. 1) lub czasie 1 min (publ. 2 i 3), w publikacji 4 pasteryzowano i mleko (85°C/30 min) i mieszankę - choć tu jest rozbieżność między schematem tej publikacji, na którym widnieją parametry 85°C/10 min a opisem w tekście, gdzie podano wartości 85 °C/1 min. Ponieważ zakres obróbki termicznej i związane z nim przemiany denaturacyjne białek serwatkowych mają wpływ na właściwości mieszanek i jakość lodów, rodzi się pytanie: jaka była faktycznie zastosowana obróbka cieplna w toku produkcji lodów? Kolejne pytanie dotyczy aktywacji kultury startowej do uzyskania 9 log jtk g⁻¹ w *inoculum*, czy i w jaki sposób w trakcie produkcji lodów kontrolowano ten parametr? W publikacji 3. jest informacja, że aktywacja kultur przebiegała do uzyskania w *inoculum* pH=4,6: czy w takim razie to było kryterium aktywowania kultur w całej pracy? Ostatnia uwaga do tej części pracy dotyczy temperatury, do której zamrażano mieszankę we frezerze, a którą określono na -22 °C, czy była to temperatura lodów czy też medium chłodzącego we frezerze? Zazwyczaj w toku produkcji, bezpośrednio po zamrożeniu we frezerze lody osiągają temperaturę nie niższą niż -10°C, w której ich konsystencja umożliwia porcjowanie i napełnianie opakowań, a dopiero po tych zabiegach poddaje się je hartowaniu do uzyskania temp. poniżej -20 °C.

W części opisującej metodykę badań nieprecyzyjne jest stwierdzenie w p. 3.3.2, że oznaczano zawartość kwasu mlekowego, podczas gdy w rzeczywistości oceniano kwasowość miareczkową, którą wyrażano w jednostkach zawartości kwasu mlekowego. Inna uwaga dotyczy opisu barwy – parametry C i h nie są zmierzone, lecz obliczane na podstawie oznaczonych wartości parametrów a^* i b^* . W opisie dotyczącym oznaczania puszystości błędnie stwierdzono, że jest to stosunek objętości powietrza w lodach do jego objętości w roztopionych lodach, podczas gdy w publikacjach źródłowych parametr ten określany jako „overrun” poprawnie zdefiniowano jako stosunek objętości powietrza zawartego w określonej objętości lodów do objętości powstałej po ich roztopieniu i odpowietrzeniu mieszanki. Opis metody oceny organoleptycznej nie zawiera analizy ogólnej pożądalności, co dałoby pełniejszy obraz jakości sensorycznej badanych lodów. Ostatnia uwaga dotyczy analizy statystycznej. Opisane w publikacjach 1 i 2 doświadczenia wykonywane były w układzie 3-czynnikowym, natomiast w publikacjach 3 i 4 układ można było traktować jako 2- lub 3-czynnikowy. W pracy zawarto informację, że przeprowadzono analizę 1-, 2- i 3-czynnikową, nie precyzując jednakże tego, którą z tych metod zastosowano przy omówieniu określonych grup wyników i w jakim celu. Moim zdaniem w analizie statystycznej powinno się stosować analizę wariancji opartą na tylu czynnikach ile ich było w układzie doświadczenia.

Pomimo powyższych uwag stwierdzić należy, że zastosowane w pracy metody analityczne umożliwiają osiągnięcie założonych celów badawczych.

Rozdział „Opis wyników i osiągnięć badawczych” podzielono na 7 podrozdziałów; w pierwszym omówiono właściwości mieszanek lodowych, a w kolejnych siedmiu weryfikowano postawione hipotezy badawcze.

W podrozdziale pierwszym dokonano omówienia wyników składu chemicznego mieszanek, które wskazują na dość dużą jego zmienność, szczególnie w przypadku zawartości białka i tłuszczu, co było konsekwencją różnic w składzie mleka owczego w publikacji 1 i 2. Mogło to mieć wpływ na stwierdzone różnice w innych badanych parametrach mieszanek i lodów, jak chociażby parametry barwy czy kwasowości miareczkowej. W przeprowadzonej dyskusji Autorka także wskazuje na bardzo dużą zmienność składu lodów analizowanych przez innych badaczy. Stosując jednakże określenie „standardowe lody” warto byłoby wskazać jakiej kategorii produktu ono dotyczy. Zdecydowanie innym składem charakteryzują się lody przemysłowe, a innym różne rodzaje lodów rzemieślniczych, które dodatkowo różnią się w zależności od rynku, na który są kierowane. Czy Autorka jest w stanie przybliżyć nam przykłady składu różnych kategorii tego typu produktów? Za nieodpowiedni uważam skrót myślowy „...w lodach mlecznych zawierających truskawki i bakterie...”. Na str. 23 jest także kontrowersyjna teza, że *L. casei* nie fermentuje laktozy do kwasu L(+) mlekowego oraz niezrozumiałe stwierdzenie, że 50% komórek szczepu *L. paracasei* wykazuje zdolność fermentacji inuliny. Oczywiście błędem jest interpretacja, że wyższa zawartość kwasu mlekowego w mieszankach z błonnikiem wynika z obecności innych kwasów organicznych w tym dodatku. Błąd ten jest powieleniem niewłaściwej nazwy oznaczenia zawartej w metodyce. Nieprecyzyjne jest także stwierdzenie ze str. 27, że dodatek błonnika jabłkowego wpłynął na redukcję liczby bakterii w lodach z *L. casei*, *L. paracasei* i *L. acidophilus*, skoro dane na wykresie 3 wskazują, że podobny zakres redukcji tych bakterii miał miejsce po zamrożeniu mieszanek z samą inuliną (bez dodatku błonnika). Nieuprawniona jest także teza, że spożycie analizowanych lodów zapewnia efekt terapeutyczny, gdyż nie było to przedmiotem badań w dysertacji. Pomimo powyższych uwag podkreślić należy wartość tej części pracy badawczej, szczególnie ważne jest wskazanie na istotność doboru odpowiedniego szczepu bakterii probiotycznych w celu uzyskania jego odpowiedniej przeżywalności po zamrożeniu mieszanki. Autorka udowodniła szczególną przydatność pod tym względem *L. rhamnosus*.

Kolejny podrozdział dotyczy weryfikacji hipotezy 1, nieco sztucznie ograniczonej niestety do wycinka wyników z publikacji 1. i 2. dotyczących lodów wyłącznie z inuliną. O braku trafności tego podejścia świadczy fakt, że w treści tego rozdziału sama Autorka kilkakrotnie odwołuje się do wyników analizy wariancji obejmującej wpływ czynnika „dodatek błonnika” (str. 29, 30, 33). Przy analizie wyników dotyczących napowietrzenia zastanawia bardzo duże napowietrzenie lodów z mieszanek fermentowanych kulturą Bb-12 i *L. rhamnosus* (publikacja 1) - wynoszące około 80%. Jak wytłumaczyć tak wysokie wartości skoro, jak sama Autorka zauważa, lody typu rzemieślniczego, a więc produkowane we frezerach bez pneumatycznego systemu napowietrzania (jaki stosowano w niniejszej pracy) cechują się poziomem tego wskaźnika w zakresie 20-40%? Odnosząc się do liczby bakterii probiotycznych w lodach Autorka twierdzi, że nie zaobserwowano wpływu stopnia napowietrzenia na ich przeżywalność, co jednakże warto byłoby poprzeć analizą współczynnika korelacji pomiędzy tymi parametrami. Zastanawiające są także wyniki dotyczące szybkości topnienia lodów. Jak można wytłumaczyć fakt, że największą topliwością charakteryzowały się produkty o największym napowietrzeniu, skoro teoria mówi, że powietrze zawarte w lodach chroni je przed zmianami temperatury i topnieniem? Ostatecznie Autorka przyjmuje hipotezę pierwszą, choć w przypadku oceny organoleptycznej wyniki analizy wariancji wskazują, że jedyną cechą, na jaką istotny wpływ miał szczep bakterii był wygląd lodów będących przedmiotem publikacji 1.; zaś w publikacji nr 2 czynnik ten nie wpływał na żaden parametr oceny organoleptycznej. Moim zdaniem jest to podejście niejednoznaczne i potwierdza to trudności w interpretacji tak szerokiej hipotezy.

Kolejny podrozdział dotyczy hipotezy 2. i w jego tytule słusznie zastosowano określenie „wpływ czasu” zamiast zawartej w hipotezie tezy, że „czas kształtuje”. Prawidłowe jest także uwzględnienie w jego treści wyników dotyczących lodów z błonnikiem jabłkowym. Uwzględnienie czasu przechowywania w badaniach dotyczących żywności jest bardzo istotne, gdyż pozwala określić stabilność przechowalniczą produktów, a w praktyce ustalić ich termin przydatności do spożycia lub datę minimalnej trwałości. Stąd wysoko oceniam kompleksową analizę zmian jakości lodów w trakcie przechowywania, jaką przeprowadzono w publikacjach 1. i 2., a opisaną w podrozdziale 4.3. Niemniej nasuwa się kilka uwag do tej części manuskryptu. Niepotrzebnie umieszczono w nim wykres 12, który powiela dane z wykresu 13. Za niepoprawną uważam konstatację na str. 38, że „nie stwierdzono istotnego wpływu czasu przechowywania na wartość parametru a^* , z wyjątkiem lodów z błonnikiem jabłkowym...”, skoro dane w tabelach 3 w publikacjach 1 i 2 wskazują na istotny wpływ tego czynnika. Poprawna interpretacja powinna zatem być następująca: był wpływ, lecz istotne różnice stwierdzono jedynie pomiędzy określonymi średnimi. Rodzi się także pytanie co mogło być przyczyną zwiększenia się puszystości lodów CCF, CA i CAF w trakcie przechowywania, gdyż zazwyczaj parametr ten ulega zmniejszeniu wskutek zmian struktury i uwalniania się powietrza z produktu. W konkluzji Autorka przyjmuje hipotezę 2., choć dane w tabelach z analizą statystyczną w publikacjach 1. i 2. wskazują, że czas nie miał istotnego wpływu na żadną z ocenianych cech sensorycznych. Jak wcześniej wspomniałem: szerokie ujęcie hipotez utrudnia ich jednoznaczną weryfikację.

W dalszej części opracowania omawiany jest wpływ zastosowanych błonników na parametry lodów. Jest to kluczowy podrozdział przedstawiający główne, zawarte w temacie tezy pracy. Przeprowadzone badania i opisane w tej części pracy wyniki są szczególnie cenne, gdyż dają odpowiedź na pytanie dotyczące możliwości zastosowania wartościowego pod względem odżywczym i technologicznym dodatku, jakim jest błonnik jabłkowy. Możliwość szerszego wykorzystania tego preparatu w produkcji żywności byłaby bardzo korzystna zarówno pod względem zdrowotnym jak również ekonomicznym. Polska jest wiodącym producentem i przetwórcą jabłek w Europie, a preparat ten jest wytwarzany prawdopodobnie z produktów ubocznych przetwórstwa tych owoców. Uzyskane w ocenianej dysertacji rezultaty są bardzo cenne, gdyż wskazują na

możliwość zastosowania badanego preparatu w produkcji lodów, choć konieczne jest uwzględnienie jego cech takich jak kwasowość czy barwa, oraz ich wpływu na wybrane parametry fizyczne, sensoryczne oraz liczebność bakterii probiotycznych. Jeśli chodzi o uwagi do tej części opracowania, to uważam, że układ wykresów obrazujących wpływ dodatku błonnika powinien być taki, że słupki lodów z błonnikiem i bez niego powinny być obok siebie, co w bardziej przejrzysty sposób uwidoczniłoby ten wpływ. Uważam także, że jednoznaczne stwierdzenie, że większy udział barwy czerwonej w lodach z błonnikiem spowodowany jest obecnością w nim związków fenolowych i pektyn powinno być potwierdzone analizami; przy ich braku zaś powinno się raczej używać określenia „prawdopodobnie” i poprzeć to danymi literaturowymi. Zauważyć także można nieścisłość w omówieniu wyników dotyczących wpływu dodatku błonnika na liczbę *L. acidophilus* w 7. i 21. dniu przechowywania. Dane na wykresach 25 i 26 oraz w tabeli 4 (publikacja 2) wskazują na istotnie wyższą liczbę bakterii tego gatunku w lodach z błonnikiem w stosunku do lodów bez tego komponentu, zaś w dysertacji (str. 47) jest teza przeciwna. Uzyskane wyniki nie dały podstaw do odrzucenia hipotezy 3, co w tym wypadku jest zgodne w wynikami analiz statystycznych w obu publikacjach, na których była ona oparta.

Dalsza część dysertacji dotyczy badań określających właściwości prozdrowotne lodów. Wartość tej części opracowania jest szczególnie wysoka, gdyż dotychczas w literaturze brak było danych odnośnie biodostępności głównych makroelementów mleka z dość specyficznej matrycy, jaką są lody z mleka owczego poddanego fermentacji przez szczepy probiotyczne. Ponadto biorąc pod uwagę mechanizmy trawienia i wchłaniania pierwiastków w przewodzie pokarmowym człowieka, istotne jest także określenie oddziaływania błonnika zawartego w lodach na biodostępność makroelementów w nich zawartych. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy niewątpliwie rzucają wiele światła na powyższe zagadnienia. Hipoteza 4. dotyczy wpływu szczepu na biodostępność makroelementów z lodów. Jej weryfikację oparto na wynikach dotyczących lodów bez dodatku błonnika, a więc stanowiących wycinek badań z publikacji 4. W publikacji tej jednakże wyniki przedstawiono w układzie uniemożliwiającym zaznaczenie istotności różnic pomiędzy średnimi ze względu na rodzaj szczepu, co prawdopodobnie było przyczyną, dla której także w dysertacji tych istotności nie przedstawiono. Skutkiem tego było ograniczenie możliwości głębszej i bardziej rzetelnej interpretacji uzyskanych rezultatów. Hipotezę 4 odrzucono na podstawie wyników dwuczynnikowej ANOVA, według których szczep miał wpływ na biodostępność wapnia i magnezu, lecz nie wpływał na tę właściwość w przypadku potasu i fosforu. Jest to inne podejście niż w przypadku weryfikacji hipotezy 2, której nie odrzucono, mimo że przyjęte w niej założenia nie były spełnione w stosunku do wszystkich parametrów ją obejmujących. W dalszej części omówienia wyników publikacji 4. Autorka weryfikuje hipotezę dotyczącą wpływu dodatku błonnika na bioprzyswajalność makroelementów. Niestety - na zaprezentowanych w dysertacji wykresach brakuje wyników grupy kontrolnej, mimo że omawiając te wyniki Autorka do nich się odwołuje (str. 56, ostatni akapit). Fakt ten pogarsza czytelność prezentowanych wyników, choć w tym przypadku publikacja źródłowa zawiera te dane w formie tabelarycznej. Podobnie jak w przypadku poprzedniej hipotezy następuje jej odrzucenie, gdyż dodatek błonnika nie wpłynął na jeden z analizowanych pierwiastków – fosfor. Powyższe uwagi nie umniejszają wartości opublikowanych w publikacji 4 wyników, które są bardzo cenne, gdyż wskazują na możliwość zmniejszenia biodostępności cennych pod względem odżywczym makroelementów w produktach z błonnikiem, co z kolei może sugerować konieczność zwiększenia ich podaży w diecie.

Dopełnieniem tematyki dysertacji są wyniki zawarte w publikacji 3., dotyczące przeżywalności bakterii probiotycznych z matrycy lodowej w symulowanych warunkach trawienia. Badania te znakomicie uzupełniają rezultaty o liczebności tych drobnoustrojów w produktach, które przedstawiono w publikacjach 1 i 2. W ten sposób uzyskano kompleksowe dane nt. możliwości potencjalnego korzystnego oddziaływania wyrobów na mikrobiotę jelitową człowieka. Szczególnie cenne i mające praktyczny, aplikacyjny wymiar są wyniki

dotyczące wysokiej liczebności bakterii na etapie trawienia w jelicie cienkim, wskazujące, że w zdecydowanej większości badanych prób wynosiła ona powyżej 10^6 jtk g^{-1} , co potwierdza potencjał terapeutyczny badanych produktów. Istotne są także wnioski, że zastosowanie preparatów błonnika poprawia przeżywalność bakterii probiotycznych, a ich liczba zależy od zastosowanego w produkcji szczepu. Żałować tylko można, że w dysertacji bardzo skrótowo przedstawiono te wartościowe dane. Być może z tego względu w prezentacji i omówieniu wyników pominięto zupełnie wyniki analizy statystycznej, co razi szczególnie w kontekście prezentowanego uzasadnienia przyjęcia obu związanych z tym zakresem badań hipotez (nr 6 i 7). Uwzględniając jednakże dane zawarte w publikacji źródłowej stwierdzić należy, że poprawnie je zweryfikowano.

Podsumowując rozdział Opis wyników i osiągnięć badawczych stwierdzam, że mimo pewnych nieścisłości, które z obowiązku recenzenta wskazuję, docenić należy, że Autorka podjęła się trudnego i ambitnego zadania przedstawienia wyników czterech rozległych publikacji w których występowały rozbudowane wieloczynnikowe układy doświadczeń. Można zatem zrozumieć trudności w jasnym i klarownym omówieniu takiego zakresu badań w zbiorczej formie jaką jest dysertacja.

W końcowej części opracowania sformułowano stosunkowo dużo, bo aż 14 wniosków, w większości poprawnie uogólniających uzyskane rezultaty i potwierdzających realizację założonych celów badawczych. Jednakże niektóre z nich, np. 5, 10 i 12, są zbyt rozbudowane i niepotrzebnie zawierają szczegółowe dane powielone z omówienia wyników. Uważam także, że jednoznaczne stwierdzenia zawarte we wnioskach powinny być poparte wynikami analizy statystycznej, podczas gdy we wniosku 6 jest stwierdzenie, że we wszystkich grupach lodów po 7 dniach przechowywania obniżyła się liczba bakterii, podczas gdy dane w publikacji 1 wskazują, że nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Bardzo cenne i trafne są wnioski 13 i 14, które podkreślają praktyczny i aplikacyjny charakter uzyskanych wyników badań, co należy szczególnie docenić.

Generalnie stwierdzić należy, że zakres przeprowadzonych badań i uzyskane wyniki pozwoliły osiągnąć założone cele badawcze.

Uzyskane rezultaty zostały w większości poprawnie i wyczerpująco przedyskutowane w oparciu o właściwie dobraną pod względem merytorycznym literaturę. W przedstawionej dysertacji wykorzystano bardzo znaczącą liczbę 226 pozycji, głównie angielskojęzycznej literatury o zasięgu międzynarodowym, spośród których większość pochodzi z ostatnich 10 lat. Fakt ten świadczy o dobrym rozeznaniu Doktorantki w literaturze przedmiotu.

W rozprawie zawarty jest także wykaz dotychczasowego dorobku Doktorantki, który dobrze świadczy o jej aktywności naukowej. Poza pracami wchodzącymi w zakres dysertacji jest ona autorem lub współautorem 7 publikacji, 10 rozdziałów w monografiach oraz 16 doniesień na konferencje.

Będąca przedmiotem recenzji dysertacja jest wartościowym opracowaniem naukowym, co jednoznacznie potwierdza fakt opublikowania wyników przeprowadzonych badań w czasopismach naukowych o wysokim współczynniku *Impact Factor*. Zawarte w recenzji komentarze, uwagi krytyczne i pytania dotyczą jedynie treści rozprawy, a nie kwestionują jakości wchodzących w jej skład artykułów naukowych, które pozytywne przeszły proces recenzji wydawniczych. Ponadto pragnę wyraźnie zaznaczyć, że uwagi te w zdecydowanej większości mają charakter dyskusyjny bądź wyjaśniający i nie negują wartości przedstawionej rozprawy oraz nie mają wpływu na jej pozytywną ocenę końcową.

4. Ocena końcowa

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Kowalczyk pt. „Wpływ dodatku błonnika i różnych szczepów probiotycznych na przeżywalność bakterii, biodostępność makroelementów oraz jakość lodów z mleka owczego” mająca formę cyklu czterech publikacji naukowych jest oryginalnym opracowaniem problemu naukowego w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Przedłożona do recenzji rozprawa świadczy zarówno o szerokiej wiedzy teoretycznej Doktorantki, jak również o jej umiejętnościach samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska **mgr inż. Magdaleny Kowalczyk** spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim określone w art. 187. ust.1 - 4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.