

Prof. dr hab. inż. Jacek Domagała
Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Kraków, 17.07.2020 r.

Recenzja
pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Szajnar pt. „Fortyfikacja związkami wapnia i
magnezu mlecznych napojów fermentowanych”
wykonanej w Zakładzie Technologii Mleczarstwa, Kolegium Nauk Przyrodniczych,
Instytutu Technologii Żywności i Żywienia, Uniwersytetu Rzeszowskiego
pod kierunkiem dr hab. inż. Agaty Znamiorskiej, prof. UR
i promotora pomocniczego dr inż. Doroty Kalickiej

Podstawa wykonania recenzji:

Pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie nr NA-e/RDT/3/2020 z dnia 10.06.2020 r.

1. Wybór tematu pracy

Wapń i magnez należą do najważniejszych makroelementów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Według danych Instytutu Żywności i Żywienia nawet połowa Polaków może mieć jednak niedobory wapnia, w tym bardzo duży odsetek dzieci i młodzieży. Według Rady Promocji Zdrowego Żywienia Człowieka w porównaniu do zalecanych dla ludzi dorosłych ilości wapnia, zarówno u kobiet jak i u mężczyzn brakuje połowy ilości tego pierwiastka w codziennych dietach. Wynika to głównie z małego spożycia mleka i produktów mleczarskich (w tym mleka fermentowanego), które są podstawowym źródłem tego pierwiastka. Ponadto absorpcja wapnia z żywności jest niezbyt wysoka, a ochrona przed jego wydzielaniem z organizmu jest dość słaba. Wszystko to prowadzi do zwiększonego ryzyka osteoporozy, nadciśnienia tętniczego czy cukrzycy typu II. Średnie spożycie magnezu w Polsce jest także niższe od zalecanego, a spożycie magnezu w krajach rozwiniętych zmniejsza się z roku na rok. Objawy niedoboru magnezu z kolei to osłabienie i łatwe męczenie się, bolesne skurcze łydek, wypadanie włosów, nieprawidłowa praca serca, zaburzenia koncentracji i uwagi. Stąd też fortyfikacja wapniem i magnezem produktów spożywczych, w tym szczególnie produktów mleczarskich wydaje się uzasadniona ze względu na małe spożycie mleka i produktów mleczarskich, a także rosnące spożycie żywności wygodnej. Technologia wzbogacania powinna uwzględniać jednak właściwy dobór soli wapniowych lub magnezowych, najlepiej ze źródeł naturalnych, nie powodujący zmian jakości sensorycznej produktu, także podczas jego przechowywania. Wyzwaniu temu po części wychodzą naprzeciw badania podjęte przez Panią mgr inż. Katarzynę Szajnar, które należy

uznać za celowe i ważne zarówno z naukowego jak i praktycznego, technologicznego oraz zdrowotnego punktu widzenia.

2. Ocena formalnej strony pracy

Mgr inż. Katarzyna Szajnar przedstawiła jako osiągnięcie naukowe cykl 5 oryginalnych prac twórczych, opublikowanych w latach 2017-2020, pod wspólnym tytułem: „Fortyfikacja związkami wapnia i magnezu mlecznych napojów fermentowanych”, które z godnie z Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U z 2003 r. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) mogą stanowić podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora nauk rolniczych. Ich lista przedstawia się następująco:

1. **Szajnar K.**, Znamirska A., Kalicka D., Kuźniar P. 2017. Fortification of yoghurts with various magnesium compounds. *Journal of Elementology*, 22(2), 559-568.
2. **Szajnar K.**, Znamirska A., Kalicka D., Zagula G. 2017. Fortification of yoghurts with calcium compounds. *Journal of Elementology*, 22(3), 869-879.
3. **Szajnar K.**, Znamirska A., Kalicka D., Kuźniar P., Najgebauer-Lejko D. 2018. Quality of yogurt fortified with magnesium lactate. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 17(3), 247-255.
4. **Szajnar K.**, Znamirska A., Kalicka D. 2019. Effects of various magnesium salts for the production of milk fermented by *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Bb-12. *International Journal of Food Properties*, 22, 1, 1087-1099.
5. **Szajnar K.**, Znamirska A., Kuźniar P. 2020. Sensory and textural properties of fermented milk with viability of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis* Bb-12 and increased calcium concentration. *International Journal of Food Properties*, 23, 1, 582-598.

Przedstawiona dokumentacja zawiera także około 30 stronicowy skrótowy opis w j. polskim badań i wyników przedstawionych w opublikowanych pracach, streszczenia w j. polskim i angielskim, oświadczenia współautorów i zestawienie dorobku naukowego Doktorantki.

Łączna liczba punktów za prace wchodzące w skład Doktoratu wg list MNiSzW z lat publikacji wynosi 185, a sumaryczny Impact Factor jest równy 4,164. Przedstawione prace są pracami zespołowymi 3-5 autorów. Kandydatka jest pierwszym autorem w tych publikacjach, a Jej udział szacowany jest na 70 - 75%. Stosowne oświadczenia w tej sprawie Kandydatki i współautorów prac znajdują się w załączonej dokumentacji. Doktorantka brała udział w tworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu doświadczeń, analizie wyników oraz przygotowywaniu

manuskryptów. We wszystkich tych pracach Doktorantka figuruje też jako autor korespondencyjny. A zatem wiodąca rola Doktorantki w powstawaniu tych prac nie budzi żadnych wątpliwości. Prace zostały opublikowane w języku angielskim, cztery z nich w czasopismach z listy JCR, należących do renomowanych czasopism zagranicznych z zakresu nauki o żywności. Wskazuje to na wysoki poziom naukowy przedstawionych prac. Warto także podkreślić, że część badań została wykonana w ramach projektu badawczego „Młody Naukowiec 2018” oraz programu „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, co z kolei dowodzi umiejętności pozyskiwania przez Doktorantkę środków finansowych na badania. Cały dorobek naukowy Kandydatki obejmuje 35 prac naukowych w tym 6 w czasopismach z listy JCR. Całkowity Impact Factor dorobku wynosi 7,084, a łączna liczba punktów MNiSzW wynosi 511.

3. Ocena merytoryczna pracy

Celem przedstawionych prac była ocena wpływu sześciu wybranych związków wapnia (węglan, cytrynian, chlorek, L-mleczan, diglicynian i D-glukonian) i sześciu związków magnezu (octan, L-pidolan, chlorek, mleczan, diglicynian i D-glukonian) zastosowanych do fortyfikacji mleka krowiego na wybrane właściwości wyprodukowanych różnych rodzajów mleka fermentowanego. Wyprodukowane i poddane analizie zostały jogurty o zawartości 2% tłuszczu przy użyciu jednej szczepionki, jogurty z mleka odtłuszczonego przy użyciu trzech różnych szczepionek (w tym jogurt probiotyczny) oraz mleko o zawartości 2% tłuszczu fermentowane przy użyciu monokultur *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Bb-12 i *Lactobacillus rhamnosus*. Doktorantka sformułowała i poddała weryfikacji aż 9 hipotez badawczych zakładających, że fortyfikacja mleka związkami magnezu lub wapnia wpływa na: stabilność termiczną białek mleka, dynamikę fermentacji, kwasowość gotowego produktu, wzrost i przeżywalność komórek baterijnych, teksturę, barwę i cechy organoleptyczne wytworzonych rodzajów mleka fermentowanego oraz że zastosowana fortyfikacja ogranicza ich synerezę, a produkty te spełniają kryterium minimum terapeutycznego określonego dla produktów probiotycznych.

O ile cel naukowy i użyteczny pracy zostały sformułowane jasno, o tyle hipotezy badawcze przedstawione są w sposób nieuporządkowany i moim zdaniem są zbyt liczne.

W krótkim wstępie do polskojęzycznego opracowania oraz we wprowadzeniach opublikowanych prac Doktorantka w oparciu o dostępną literaturę przedmiotu przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat wzbogacania żywności, zapotrzebowania na wapń i magnez, skutków niskiej podaży tych pierwiastków w diecie człowieka, czynników wpływających na

biodostępność wapnia i magnezu z mleka i produktów mleczarskich. Na podstawie badań innych autorów Doktorantka dokonała także krótkiej charakterystyki związków stosowanych do fortyfikacji produktów mleczarskich oraz zasad ich doboru, ze szczególnym uwzględnieniem ich wpływu na wzrost i przeżywalność bakterii probiotycznych, w tym bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus*.

W części metodycznej Doktorantka zawarła opis zastosowanych metod badawczych. Zastosowała standardowe metody analizy mleka fermentowanego, w tym oceny organoleptycznej w skali 9-punktowej, pH, kwasowości miareczkowej i kwasowości ogólnej, synerezy oznaczanej dwiema metodami, tekstury i barwy oznaczanych metodami instrumentalnymi. Analizy mikrobiologiczne obejmowały oznaczanie liczby komórek poszczególnych charakterystycznych grup drobnoustrojów na odpowiednich podłożach oraz badania wzrostu komórek bakterii na podstawie analizy gęstości optycznej mleka metodą spektrofotometryczną. Zastosowane metody badawcze są adekwatne do postawionego celu badań, a statystyczna analiza uzyskanych wyników nie budzi zastrzeżeń.

Otrzymane wyniki pozwoliły Doktorantce na pozytywne zweryfikowanie jednej ze sformułowanych hipotez badawczych zakładającej, że wyprodukowane rodzaje mleka fermentowanego fortyfikowane związkami wapnia lub magnezu spełniają kryterium minimum terapeutycznego określonego dla produktów probiotycznych. W przypadku pozostałych hipotez - mimo wpływu pojedynczych związków na badane wyróżniki, które Doktorantka szczegółowo omówiła, postawione hipotezy jako całość zostały zweryfikowane negatywnie. I tak Doktorantka stwierdziła, że zastosowana fortyfikacja mleka związkami wapnia lub magnezu nie wpływa na stabilność termiczną białek mleka, gdyż badane próbki mleka fortyfikowanego przetrwały bez objawów denaturacji proces repasteryzacji w temperaturze 72°C przez 15 s. Sformułowanie tej hipotezy i sposób jej weryfikacji budzą jednak moje wątpliwości gdyż *de facto* nie badano tu stabilności termicznej mleka, nie zastosowano żadnej metody badania stabilności termicznej, a wnioskowano jedynie na podstawie zachowania właściwości mleka po ogrzewaniu w temp. 72 przez 15 s. Możliwe, że gdyby zastosowano którąś ze standardowych metod badania stabilności termicznej mleka okazałoby się, że taka fortyfikacja jednak w jakiś sposób na stabilność termiczną wpływa. Podobnie różne mogłyby być wyniki gdyby do wszystkich badanych związków zastosowano warunki pasteryzacji stosowane w pracy nr 3, tj. pasteryzację w temp. 85° przez 30 min. Stąd też moim zdaniem hipoteza I powinna mieć brzmienie: fortyfikacja mleka zastosowanymi związkami wapnia lub magnezu umożliwia zachowanie właściwości koloidalnych mleka po pasteryzacji HTST. Druga postawiona hipoteza zakładała, że fortyfikacja mleka związkami wapnia lub fosforu

wpływa na dynamikę fermentacji, mierzoną zmianami wartości pH i badaniami gęstości optycznej mleka podczas inkubacji. Doktorantka wykazała, że spośród zastosowanych do fortyfikacji związków wapnia lub magnezu niektóre wpływają korzystnie, a niektóre niekorzystnie na proces fermentacji, jednak istnieją takie związki (np. chlorek wapnia lub cytrynian wapnia) których dodanie do mleka zapewnia warunki fermentacji zbliżone do warunków kontrolnych. Nasuwa się tu jednak pytanie czy w analizie zmian pH mleka po fermentacji uwzględniono zmiany pH mleka spowodowane dodatkiem badanych związków, które Autorka omówiła wcześniej. Kolejna postawiona hipoteza zakładała, że fortyfikacja mleka związkami wapnia lub magnezu wpływa na kwasowość produktów fermentowanych. W tym przypadku większość zastosowanych związków wapnia i magnezu nie wpływała istotnie na kwasowość różnych rodzajów mleka fermentowanego zarówno świeżych jak i przechowywanych, były więc podstawy do odrzucenia hipotezy. Odrzucono także hipotezę czwartą, zakładającą, że fortyfikacja mleka związkami wapnia lub magnezu ogranicza synerezę produktów fermentowanych. Jakkolwiek w przypadku niektórych związków magnezu Doktorantka stwierdziła ograniczenie synerezy to jednak związki wapnia powodowały wzrost synerezy, a w przypadku mleka fermentowanego przez *Bifidobacterium* nie stwierdzono istotnych różnic w synerezie niezależnie od rodzaju użytego związku wapnia. Kolejne dwie hipotezy dotyczyły wpływu fortyfikacji mleka związkami wapnia lub magnezu na teksturę i barwę produktów fermentowanych. Doktorantka wykazała, że takie dodatki jak węglan wapnia, cytrynian wapnia czy mleczan magnezu nie zmieniają właściwości teksturalnych produktów fermentowanych. W przypadku pozostałych związków stwierdzono zmiany w twardości i adhezyjności produktów. Zastosowane do wzbogacania związki wapnia lub magnezu w różnym stopniu zmieniały też składowe barwy produktów fermentowanych, jednak chlorek magnezu i węglan wapnia nie wywoływały istotnych zmian parametrów barwy.

Najciekawsze i najbardziej wartościowe aspekty rozprawy dotyczą – moim zdaniem - wpływu fortyfikacji na mikroflorę badanych produktów, szczególnie mikroflorę probiotyczną oraz na właściwości organoleptyczne gotowych produktów. Doktorantka wykazała, że wzrost komórek *Bifidobacterium* Bb-12 najlepiej był stymulowany przez chlorek, cytrynian i węglan wapnia oraz D-glukonian magnezu, a najlepszą przeżywalność komórek zapewniały węglan, cytrynian, diglicynian wapnia i szczególnie diglicynian magnezu. Na wzrost i przeżywalność komórek *Lactobacillus rhamnosus* stymulująco wpływały szczególnie związki wapnia (węglan, cytrynian, diglicynian i D-glukonian), a największą ich przeżywalność zapewniał węglan wapnia. Mleczan magnezu w większości przypadków nie wpływał istotnie na wzrost liczby bakterii jogurtowych i probiotycznych. Podobny brak stymulacji wykazano przy

zastosowaniu chlorku wapnia i mleczanu wapnia. Do związków w najmniejszym stopniu zmieniających cechy organoleptyczne badanych rodzajów mleka fermentowanego Doktorantka zaliczyła mleczan magnezu, D-glukonian magnezu i cytrynian wapnia. Dodatkowo Doktorantka nie stwierdziła wpływu związków magnezu na cechy organoleptyczne jogurtu probiotycznego. Inne dodatki, w przypadku pozostałych badanych produktów intensyfikowały smak kwaśny, zwiększały smak słony i obcy oraz zapach octowy i obcy.

Uzyskane wyniki badań Autorka przedyskutowała z wynikami innych autorów, posługując się głównie pozycjami literatury anglojęzycznej z ostatnich 15 lat, których dobór nie budzi zastrzeżeń. Świadczy to o bardzo dobrym rozeznaniu Doktorantki w aktualnej literaturze przedmiotu.

Opracowanie kończy się przedstawieniem ogółem 16 stwierdzeń i wniosków. Są one zbyt obszerne i w większości mają charakter stwierdzeń występujących już w omówieniu wyników. Wnioski powinny być bardziej syntetyczne i pogrupowane, powinny też w większym stopniu odnosić się do postawionych hipotez. Brak też wniosku użytecznego który wskazywałby konkretnie który z zastosowanych do fortyfikacji związków jest zadaniem Doktorantki najbardziej uniwersalny w aspekcie przeprowadzonych badań. Streszczenie jest praktycznie dokładnym powtórzeniem stwierdzeń i wniosków.

Po lekturze prac wchodzących w skład rozprawy oraz ich polskojęzycznego omówienia, oprócz przedstawionych już wątpliwości nasuwają się jeszcze następujące pytania i uwagi krytyczne:

- jakie były kryteria i motywy wyboru zastosowanych w badaniach związków wapnia i magnezu?
- dlaczego do repasteryzacji mleka fortyfikowanego stosowano temperaturę 72°C przez 15 s w pracach 1,2,4 i 5, a w pracy nr 3 temperaturę 85°C przez 30 min.?
- dlaczego w pracach 1 i 2 nie przeprowadzono oceny organoleptycznej jogurtów produkowanych z mleka fortyfikowanego?
- w odniesieniu do tytułu opracowania - obecnie odchodzi się od stosowania terminu „mleczne napoje fermentowane” dla płynnych produktów fermentacji mlekowej. Zalecane jest stosowanie terminu „mleko fermentowane” lub „różne rodzaje mleka fermentowanego”. W tym kontekście jogurt też jest jednym z rodzajów mleka fermentowanego;
- jak Doktorantka odniosłaby się do zarzutu, że w swoich badaniach promuje wprowadzanie dodatków chemicznych do żywności?
- czy tego typu fortyfikacja jest – zdaniem Doktorantki - skuteczniejsza niż oddzielne stosowanie suplementów diety (zawierających wapń i magnez) i mleka fermentowanego?

Przedstawione pytania i uwagi krytyczne mają w większości charakter dyskusyjny bądź wyjaśniający, dotyczą tylko części przedstawionych badań i nie umniejszają wartości całości przedstawionej rozprawy oraz nie mają wpływu na jej pozytywną ocenę. Doktorantka wykonała obszerne badania, posługując się odpowiednimi metodami badawczymi uzyskała ciekawe i wartościowe wyniki o czym świadczy fakt ich opublikowania w renomowanych czasopismach. Uzyskane wyniki mają także wartość aplikacyjną i mogą się przyczynić do opracowania nowych rodzajów mleka fermentowanego. Prace Doktorantki wnoszą nowe wartości i stanowią Jej oryginalny wkład w rozwój nauki o żywności.

6. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Szajnar pt.: „Fortyfikacja związkami wapnia i magnezu mlecznych napojów fermentowanych” jest oryginalnym opracowaniem naukowym spełniającym warunki określone w art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz U. 2003, Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) oraz Rozporządzeniu MNiSzW z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. (Dz.U. 2018, poz. 261).

Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Szajnar do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

