

dr hab. inż. Jarosław Kowalik, prof. UWM
Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 02.12.2024 r.

Recenzja
pracy doktorskiej mgr inż. Kamila Szopy
pt. „ Probiotyczne kozie i owcze mleko fermentowane z kolagenem” wykonanej
pod kierunkiem dr hab. inż. Agaty Znamirowskiej – Piotrowskiej, prof. UR
w Zakładzie Technologii Mleczarstwa, Instytutu Technologii Żywności i Żywnienia,
Uniwersytetu Rzeszowskiego

Podstawa wykonania recenzji:

*Uchwała nr 10/09/2024 Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego
z dnia 20 września 2024 roku.*

*Pismo informujące o ww. uchwale, otrzymane od Prorektora ds. Kolegium Nauk Przyrodniczych
dr hab. Józefa Cebulskiego, prof. UR. z dnia 7 października 2024 roku.*

Rozprawa doktorska została przedstawiona jako zbiór trzech prac naukowych. Publikacje, które powstały w wyniku przeprowadzonych badań opublikowano w czasopismach znajdujących się w wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) z dnia 18 lutego 2021 r., 21 grudnia 2021 r. oraz z dnia 5 stycznia 2024

Publikacja 1.

Szopa, K.; Znamirska-Piotrowska, A.; Szajnar, K.; Pawlos, M. Effect of Collagen Types, Bacterial Strains and Storage Duration on the Quality of Probiotic Fermented Sheep's Milk. *Molecules* **2022**, 27 (9), 3028. <https://doi.org/10.3390/molecules27093028>

Punkty MNiSW:140

IF: 4,600

Doktorant w oświadczeniu stwierdził, że wkład jego pracy naukowej w ramach pierwszej publikacji obejmował: koncepcję badań (współtworzenie zarysu pracy, określenie zagadnień, przeszukiwanie baz danych literaturowych, opracowanie receptury probiotycznych napojów fermentowanych na bazie mleka koziego, przygotowanie metodyki oraz walidację stosowanych

metod badawczych), przygotowanie probiotycznego mleka fermentowanego na bazie mleka owczego, analizę i zestawienie wyników, interpretację wyników i ich opis, przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu oraz kontakt z edytorem czasopisma.

Publikacja 2.

Szopa, K.; Pawlos, M.; Znamirowska-Piotrowska, A. Effect of Storage Time and Bacterial Strain on the Quality of Probiotic Goat's Milk Using Different Types and Doses of Collagens. *Molecules* **2023**, *28*, 657. <https://doi.org/10.3390/molecules28020657>

Punkty MNiSW:140

IF: 4,600

W drugiej publikacji doktorant przedstawił swój udział w tworzeniu koncepcji badań, w tym zarysu pracy, określenia zagadnień, przeszukiwania baz danych i zbioru literatury oraz opracowania receptury produkcji probiotycznego koziego mleka fermentowanego. Ponadto, brał udział w wyborze materiału badawczego, doborze zastosowanych metod badawczych oraz parametrów analitycznych, przygotowaniu metodyki i walidacji stosowanych metod. Współtworzył formę graficzną zestawienia wyników oraz zajmował się ich interpretacją i opisem. Doktorant przygotował pierwszą wersję manuskryptu, a po wysłaniu do czasopisma pełnił obowiązki autora korespondencyjnego.

Publikacja 3.

Szopa, K.; Szajnar, K.; Pawlos, M.; Znamirowska-Piotrowska, A. Probiotic Fermented Goat's and Sheep's Milk: Effect of Type and Dose of Collagen on Survival of Four Strains of Probiotic Bacteria during Simulated *In Vitro* Digestion Conditions. *Nutrients* **2023**, *15*, 3241. <https://doi.org/10.3390/nu15143241>

Punkty MNiSW:140

IF: 5,900

W trakcie tworzenia trzeciej publikacji doktorant uczestniczył w opracowywaniu koncepcji badań, zarysu pracy, analizie baz danych oraz zbiorze literatury, przygotowaniu metodyki i walidacji stosowanych metod, analizie i zestawieniu wyników oraz przygotowaniu części graficznej prezentacji wyników. Pan mgr inż. Kamil Szopa przygotował również wstępną wersję manuskryptu, uwzględniając uwagi promotora, i pełnił funkcję autora korespondencyjnego po wysłaniu artykułu do czasopisma.

Aby lepiej zobrazować wkład pracy doktoranta w tworzenie zbioru publikacji, stanowiących podstawę pracy dyplomowej warto byłoby przedstawić procentowy udział poszczególnych autorów w ich opracowywaniu. Choć nie jest to obowiązkowe, takie zestawienie

mogłoby dokładniej oddać charakter i zakres włożonego w niniejsze prace wysiłku intelektualnego doktoranta.

Głównym celem rozprawy naukowej było określenie wpływu dodatku różnych rodzajów kolagenu (hydrolizatu i kolagenu wołowego) w dwóch stężeniach (1,5% i 3,0%) podczas przechowywania napojów fermentowanych z mleka owczego i koziego. W celu zróżnicowania próbek dodawano różne szczepy monokultur bakterii potencjalnie probiotycznych takich jak: *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus paracasei* oraz *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Wszystkie oznaczenia fizykochemiczne oraz mikrobiologiczne przeprowadzono po 1 i 21 dniu przechowywania w warunkach chłodniczych.

W badaniach opisanych w trzech publikacjach określono nie tylko właściwości fizykochemiczne i mikrobiologiczne, ale również przeżywalność szczepów bakterii w układzie pokarmowym. W pracy badawczej oceniono mikrobiologiczne, cytologiczne i fizykochemiczne właściwości surowego mleka koziego i owczego pochodzącego z gospodarstw w powiatach tatrzańskim i nowosądeckim, od owiec ras mieszanych, oraz mleka od kóz ras mieszanych z gospodarstwa w powiecie rzeszowskim, województwo podkarpackie, w miesiącu czerwcu.

W pracy zastosowano odpowiednio dobrane metody badawcze oraz właściwą liczbę powtórzeń, co umożliwiło zastosowanie metod statystycznych do analizy wyników i formułowania wniosków. Na uwagę zasługuje umiejętne wykorzystanie narzędzi analizy statystycznej, takich jak jedno-, dwu- i trzyczynnikowa analiza wariancji ANOVA, w celu zbadania ogólnego wpływu rodzaju i dawki kolagenu, czasu przechowywania oraz rodzaju bakterii na właściwości probiotycznego, fermentowanego mleka owczego i koziego.

Celem aplikacyjnym rozprawy było określenie możliwości wykorzystania kolagenu w produkcji probiotycznego mleka fermentowanego z mleka owczego i koziego.

Doktorant sformułował cztery hipotezy badawcze, które w dużej mierze zostały zweryfikowane na podstawie przeprowadzonych badań.

Hipoteza 1. Rodzaj (wołowy i hydrolizat) i dawka kolagenu (1,5 i 3%) wpływają na kwasowość, teksturę, synerzę oraz barwę fermentowanego mleka owczego i koziego.

Weryfikacja tej hipotezy wymagała szczegółowej analizy właściwości fermentowanego mleka owczego i koziego po 1 i 21 dniu przechowywania, a także oceny wpływu rodzaju i dawki zastosowanego kolagenu na cechy różnych wariantów produktów.

Wyniki analiz oraz ich szczegółowe omówienie i dyskusję doktorant przedstawił w publikacjach 1 i 2.

Na uwagę zasługuje fakt, że doktorant na tym etapie badań przeprowadził szeroki zakres analiz fizykochemicznych surowców oraz uzyskanych wariantów produktów fermentowanych,

które różniły się zawartością kolagenu wołowego, hydrolizatu oraz czterema różnymi szczepami bakterii probiotycznych. Badania na tym etapie zostały bardzo dobrze opisane w publikacjach. Pojawia się pytanie dotyczące zawartości LKS (liczby komórek somatycznych) w surowym mleku kozim. Wartość LKS wynosiła 587 777, stąd pytanie, czy istnieją standardy określające maksymalną dopuszczalną wartość i co może świadczyć o uzyskanym wyniku?

Autor, opisując skład i charakterystykę fizykochemiczną mleka dwóch gatunków ssaków, uwzględniając takie parametry jak kwasowość, gęstość, zawartość białka, laktozy, tłuszczu i punkt zamarzania, podsumował, że na zawartość białka i tłuszczu wpływają głównie dieta i rasa. Czy istnieją jeszcze inne czynniki, które mogą mieć wpływ na jakość fizykochemiczną badanego mleka?

Na tym etapie badań użyto określenia „próby mleka”, czy jednak nie należałoby stosować terminu „próbki”?

Doktorant w badaniach określał zawartość kwasu mlekowego oraz wartość pH wszystkich wariantów napojów fermentowanych po 1 dniu i po 21 dniach przechowywania. Wyniki w większości przypadków wskazały na wyższą zawartość kwasu mlekowego oraz niższą wartość kwasowości czynnej. W rozprawie jednak nie wyjaśniono, w jaki sposób obliczono zawartość kwasu mlekowego [g]. Podczas oznaczania zjawiska synerezy (czyli obkurczania się żelu, a później skrzepu) dochodzi do wydzielania serwatki, która jest naturalnym procesem, często uważanym przez konsumentów za wadę produktu. W rozprawie bardzo szczegółowo opisano to zjawisko, prezentując wyniki w formie tabel, które określają stopień synerezy w [%]. Wykazano, że wyciek serwatki w pierwszym dniu przechowywania wynosił od 8 do 34% w przypadku mleka owczego oraz od 45 do 59% dla próbek mleka koziego. Natomiast po 21 dniach stwierdzono, że dodatek hydrolizatu skutecznie ograniczał synerezę. Zaobserwowano również, że pałeczki *Lactobacillus acidophilus* prawdopodobnie powodują wyższy stopień synerezy we wszystkich napojach fermentowanych. Jaki może być mechanizm działania tych pałeczek w tym przypadku?

Dodanie kolagenu do mleka owczego i koziego spowodowało zmniejszenie jasności barwy. Wszystkie warianty mleka fermentowanego charakteryzowało się wyraźnym udziałem barwy zielonej i żółtej. W jakim stopniu udział barwy zielonej i żółtej wpłynął na ocenę pożądalności barwy produktów?

Podczas publicznej obrony proszę również odpowiedzieć na pytanie: czy korzyści płynące z zastosowania różnych rodzajów kolagenu jako dodatków funkcjonalnych mogą zrównoważyć dodatkowe koszty zarówno dla producenta (zakup dodatkowego składnika), jak i konsumenta (prawdopodobnie wyższa cena produktu)?

Uzyskane przez autora rozprawy wyniki nie potwierdziły hipotezy 1, która została zweryfikowana negatywnie.

Hipoteza 2.

Doktorant postanowił zweryfikować kolejną hipotezę: **wzrost i przeżywalność szczepów bakterii probiotycznych w mleku fermentowanym kształtuje rodzaj i dawka kolagenu.**

Przeprowadzona analiza liczby żywych komórek bakterii wykazała, że w pierwszym dniu przechowywania jedynie dodatek kolagenu wołowego w mleku kozim w ilości 1,5% i 3,0% istotnie zwiększył populację *L. rhamnosus*. Natomiast w fermentowanym mleku owczym zaobserwowano niższą liczbę komórek *L. rhamnosus* i *L. paracasei* w porównaniu do mleka kontrolnego. Dotyczyło to próbek z dodatkiem 1,5% kolagenu wołowego oraz 3,0% dodatku hydrolizatu. Autor stwierdził, że rodzaj i dodatek kolagenu nie miały wpływu na wzrost liczby komórek *L. acidophilus* i *L. casei* w mleku owczym oraz *L. paracasei*, *L. acidophilus* i *L. casei* w mleku kozim. Po 21 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych jedynie szczep *L. casei* w mleku owczym i kozim był zdolny do wzrostu przy dodatku 3% hydrolizatu. Doktorant w badaniach nie stwierdził wpływu rodzaju ani dawki kolagenu na przeżywalność szczepu *L. paracasei* w mleku kozim podczas przechowywania.

W ten sposób autor rozprawy, weryfikując hipotezę 2, uzasadnił jej odrzucenie.

Hipoteza 3. Rodzaj mleka i czas przechowywania wpływają na cechy organoleptyczne i fizykochemiczne probiotycznego mleka fermentowanego.

W tych badaniach doktorant oznaczał wartość pH podczas przechowywania napojów, jednak bez dodatku kolagenu. We wszystkich grupach fermentowanego mleka stwierdzono, że czas przechowywania powodował wzrost kwasowości czynnej. Bardzo niską wartość pH (3,85) uzyskano dla produktu na bazie mleka owczego z dodatkiem *L. paracasei* po 21 dniach przechowywania, natomiast w mleku kozim najniższe pH oznaczono w mleku fermentowanym przez *L. acidophilus* (4,16). Pojawia się pytanie, czy tak niskie pH może wpłynąć na odczucia smakowe konsumentów?

W przypadku badania składowych tekstury (twardość, kohezyjność i sprężystość) autor wykazał, że twardość żelu zależy od rodzaju mleka. Mleko owcze charakteryzowało się twardszym żelem niż mleko kozie.

Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku stopnia synerезy, który był wyższy w fermentowanym mleku kozim. W odniesieniu do kohezyjności, większą siłą spójności wykazywało mleko kozie. Natomiast w przypadku sprężystości, w rozprawie przedstawiono wyższe wartości dla produktów na bazie mleka owczego. Czy na tę sytuację mogła wpłynąć wyższa zawartość suchej masy w mleku owczym?

Jeżeli chodzi o przeprowadzoną ocenę organoleptyczną doktorant wykazał, że na składowe smaku badanego mleka fermentowanego koziego i owczego wpływał głównie rodzaj dodanego kolagenu. Za pozytywny efekt badań należy uznać fakt, że dodatek kolagenu do mleka koziego nie nasilał charakterystycznego smaku koziego, który często jest nieakceptowany przez konsumentów, a wręcz intensyfikował smak mleczno-kremowy i słodki.

Szczegółowa analiza wyników w tej części pracy nie pozwoliła na przyjęcie hipotezy 3, ponieważ rodzaj mleka i czas przechowywania wpływały jedynie na wybrane właściwości badanego mleka, co jest zgodne z uzyskanymi danymi.

Hipoteza 4. Rodzaje mleka i rodzaje kolagenu wpływają na przeżywalność komórek bakterii probiotycznych w układzie pokarmowym (in vitro).

Doktorant w rozprawie poświęcił miejsce również zagadnieniom związanym z przyswajalnością przygotowanych, badanych napojów fermentowanych (publikacja 3). Zagadnienie jest kluczowe z punktu widzenia ich właściwości funkcjonalnych.

W tym celu przeprowadzono proces trawienia in vitro, który miał na celu określenie wpływu rodzaju mleka i dodatku kolagenu na przeżywalność szczepów probiotycznych. W wyniku tego badania dwa szczepy *L. casei* i *L. paracasei* wykazały najkorzystniejszą przeżywalność w symulowanych warunkach żołądkowo-jelitowych (około 60%). Najniższą przeżywalność odnotowano natomiast dla szczepu *L. rhamnosus*. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała, że na przeżywalność komórek bakterii probiotycznych wpływały szczep, rodzaj mleka, rodzaj kolagenu oraz interakcje tych trzech czynników. Warto podkreślić, że wyniki badań wskazały na dobrą przeżywalność probiotyków zarówno w mleku kozim, jak i owczym. We wszystkich grupach mleka, po 21 dniach przechowywania, liczba komórek bakterii przekraczała $8 \log \text{ jtk g}^{-1}$. Może to stanowić podstawę do dalszych działań aplikacyjnych w tym zakresie.

Doktorant uznał słusznie, że nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy 4.

Podsumowując, wszystkie trzy publikacje stanowiące pracę doktorską Pana mgr inż. Kamila Szopy oceniam pozytywnie. Zawarte w nich treści stanowią oryginalne podejście do rozwiązania problemu naukowego, jakim było określenie wpływu dodatku różnych form kolagenu oraz różnych gatunków probiotyków na cechy jakościowe mlecznych napojów fermentowanych na bazie mleka owczego i koziego. Publikacje te świadczą o wysokich umiejętnościach doktoranta w zakresie planowania i prowadzenia badań naukowych oraz analizy ich wyników. Warto podkreślić, że poziom dyskusji naukowej w publikowanych pracach ulegał

znaczącej ewolucji, a dojrzałość naukowa doktoranta przejawia się również w umiejętności definiowania zagadnień wymagających dalszych badań. Ważnym efektem naukowym jest również to, że cel pracy został poparty dobrze opracowanymi wnioskami.

Moje drobne uwagi nie umniejszają wartości naukowej tej rozprawy, w tym jej wartości poznawczej, znaczenia podjętego problemu naukowego oraz metodologii badawczej, lecz stanowią wskazówki przy planowaniu kolejnych badań oraz przygotowywaniu przyszłych publikacji.

Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska wskazuje na bardzo obiecujący kierunek badań o charakterze technologiczno-aplikacyjnym, stanowiący cenny wkład w rozwój nauki w zakresie szeroko pojętej żywności funkcjonalnej, szczególnie w kontekście branży mleczarskiej. Praca doktorska Pana mgr inż. Kamila Szopy pt.: "Probiotyczne kozie i owcze mleko fermentowane z kolagenem" wnosi nowe elementy poznawcze i istotnie poszerza wiedzę w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Rozprawa ta spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r., poz. 1571 ze zm.), wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie o dopuszczenie Pana mgr inż. Kamila Szopy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

dr hab. inż. Jarosław Kowalik, prof. UWM