

**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 Żywienia,**  
**Uniwersytetu Rzeszowskiego**

***Podstawa wykonania recenzji:***

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

**1. Ocena znaczenia podjętej tematyki badawczej**

Stale obserwuje się wzrost zainteresowania żywnością funkcjonalną. Wynika to ze zwiększenia świadomości konsumentów, którzy coraz częściej zwracają uwagę na wartość odżywczą spożywanych produktów, w tym także na ich cechy prozdrowotne wykraczające poza zawartość podstawowych składników odżywczych. Zjawisku temu sprzyja łatwość dostępu do wiedzy, w tym do wyników badań naukowych, które jednoznacznie wskazują na związek sposobu żywienia ze stanem zdrowia i szeroko rozumianą jakością życia. Producenci żywności stają więc przed wyzwaniami dotyczącymi opracowywania nowych produktów, które z jednej strony będą się charakteryzować jak najlepszymi walorami prozdrowotnymi, a z drugiej wysoką jakością sensoryczną. Za tym nurtem podąża także świat nauki o żywności, realizując badania dotyczące możliwości opracowywania nowych produktów oraz ocenę ich właściwości jakościowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich cech odżywczych, w tym prozdrowotnych. Żywność probiotyczna stanowi jeden z głównych, stale rozwijających się segmentów żywności funkcjonalnej. W grupie tej dominują produkty mleczarskie, które ze względu na swoje cechy są dobrą matrycą dla bakterii probiotycznych oraz innych bioaktywnych składników; należy jednak zwrócić uwagę na to, aby zastosowane dodatki nie miały negatywnego wpływu na liczbę i przeżywalność bakterii.

Zastosowanie kolagenu jako dodatku do koziego i owczego mleka fermentowanego jest ciekawą propozycją zwiększenia ich właściwości odżywczych. Białko to stanowi podstawowy składnik tkanki łącznej, występuje głównie w kościach, ścięgnach, skórze, mięśniach, zębach, ale stanowi także składnik wielu narządów. Zawartość kolagenu w diecie jest szczególnie ważna dla osób starszych, gdyż wraz z wiekiem zmniejsza się możliwość syntezy tego białka w organizmie. Biorąc pod uwagę szybko starzejące się społeczeństwo oraz wzrost długości życia, wzbogacanie żywności kolagenem może być ważnym czynnikiem wpływającym na stan zdrowia konsumentów w podeszłym wieku.

Ważnym wątkiem niniejszej pracy jest także wykorzystanie mleka koziego i owczego jako surowca do produkcji probiotycznego mleka fermentowanego. Wyroby z mleka tych gatunków zwierząt, mają w Polsce raczej charakter produktów niszowych, a przez to ograniczone jest ich spożycie. Wykorzystanie tego rodzaju surowców do produkcji probiotycznego mleka fermentowanego z dodatkiem kolagenu jest ciekawą propozycją zarówno od strony naukowej jak i praktycznej. Dotychczas w literaturze naukowej brakuje opracowań obejmujących wieloczynnikową kompleksową ocenę właściwości jakościowych fermentowanego z udziałem bakterii probiotycznych mleka koziego i owczego z kolagenem. Wartość niniejszej dysertacji wynika z uwzględnienia takich czynników doświadczalnych jak rodzaj i dawka kolagenu, szczep bakterii, rodzaj mleka oraz czas przechowywania. Na uwagę zasługuje także całościowa analiza materiału badawczego obejmująca cechy fizykochemiczne, organoleptyczne i mikrobiologiczne produktów, a także ocena cech funkcjonalnych polegająca na ocenie przeżywalności bakterii probiotycznych w symulowanych (*in vitro*) warunkach trawienia w przewodzie pokarmowym. Należy podkreślić także aspekt praktyczny niniejszej dysertacji. Częstokroć produkty owcze i kozie, jako niszowe wytwarzane są w małych lokalnych zakładach, które nie mają możliwości samodzielnego prowadzenia prac badawczo-rozwojowych. Przetawione w pracy wyniki mogą być zatem wykorzystane także przez tego rodzaju podmioty jako materiał źródłowy do wdrożenia nowych funkcjonalnych produktów mleczarskich.

W świetle powyższych faktów uważam, że podjęty przez mgr inż. Kamila Szopę temat pracy doktorskiej jest istotny dla rozwoju dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia. Dodatkowym atutem ocenianej pracy jest fakt, że wpisuje się ona w nurt badań naukowych o charakterze użytkowym, a więc mających potencjalne zastosowanie w praktyce przemysłowej. Jest to szczególnie istotne gdy weźmie się pod uwagę ostatnie trendy w Polsce i Europie wskazujące na konieczność większego zaangażowania świata nauki w rozwiązywanie bieżących problemów społeczno-gospodarczych.

## 2. Ocena formalnej strony pracy

Przedstawiona przez mgr inż. Kamila Szopę praca ma formę spójnego tematycznie cyklu publikacji, składającego się z następujących artykułów naukowych:

1. **Szopa, K.;** Znamirowska-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>
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>.
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>.

Powyższe prace opublikowano w latach 2022-2023 w angielskojęzycznych, indeksowanych przez *Journal Citation Report* czasopismach naukowych, znajdujących się także w wykazie czasopism MNiSW. Ich sumaryczny wskaźnik *Impact Factor* (wg roku publikacji) wynosi 13,6, zaś łączna liczba punktów według list czasopism zawartych w wykazie MEiN/MNiSW liczona zarówno w roku publikacji jak i według stanu obecnego wynosi 420 pkt. Zgodnie z danymi z baz Web of Science oraz Scopus prace były dotychczas cytowane odpowiednio 7 i 10 razy. Pomimo, że w przedłożonym autoreferacie widnieje wartość sumarycznego wskaźnika IF 15,1, wynikająca najprawdopodobniej z jego przygotowania przed opublikowaniem aktualnych wartości za 2023 rok przez bazę JCR, to bieżący wskaźnik IF należy uznać za wysoki i w pełni wystarczający do ubiegania się o stopień naukowy doktora. Docenić ponadto należy wysiłek Doktoranta, który zdecydował się na dysertację w formie cyklu publikacji i w ciągu zaledwie dwóch lat opublikował aż 3 artykuły w wysoko punktowanych czasopismach.

Zawarte w dysertacji publikacje to oryginalne eksperymentalne prace badawcze. Wszystkie artykuły mają charakter zespołowy, w dwóch liczbą autorów wynosi 4, zaś jeden jest autorstwa 3 osób. We wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem, zaś jednym z współautorów jest także Pani Promotor pracy doktorskiej.

Zgodnie z załączonymi do dysertacji oświadczeniami Doktoranta oraz wszystkich Współautorów, określającymi indywidualny wkład każdego z nich w wykonaną pracę zbiorową, Doktorant aktywnie uczestniczył w procesie twórczym wszystkich publikacji. Jego funkcja polegała na: opracowaniu koncepcji badań – współtworzeniu zarysu pracy, analizie zagadnień, zbieraniu literatury, opracowaniu receptur i metod produkcji badanych wyrobów, określeniu zakresu i metodyki analiz, walidacji stosowanych metod i przygotowaniu materiału badawczego; wykonywaniu badań; zestawieniu, analizie, opisie i interpretacji wyników; przygotowaniu manuskryptu; wysłaniu publikacji oraz kontakcie z edytorem. Rola Pani Promotor polegała na współuczestniczeniu w tworzeniu koncepcji badań oraz nadzorze nad ich realizacją, a także na wspomaganiu procesu edycji manuskryptu. Udział pozostałych Współautorek dotyczył pomocy i nadzoru podczas wykonywania analiz, wspomaganie podczas pisania manuskryptu oraz korekty językowej. Z dołączonych oświadczeń wynika także, że wszyscy Współautorzy akceptują zadeklarowany przez Doktoranta udział w procesie twórczym i wyrazili zgodę na przedłożenie przez mgr inż. Kamila Szopę powyższych publikacji jako części jego rozprawy doktorskiej. Podsumowując – stwierdzić należy, że rola Doktoranta była wiodąca w procesie twórczym samodzielnej i wyodrębnionej części pracy zbiorowej w postaci przedstawionych w dysertacji publikacji i potwierdza jego przygotowanie do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przedłożona do recenzji rozprawa ma układ redakcyjny typowy dla tego typu opracowań naukowo-badawczych. Wstępną część pracy stanowi: strona tytułowa, oświadczenie dotyczące procedury antyplagiatowej, strona z podziękowaniami, spis treści, wykaz skrótów stosowanych w rozprawie, wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską. Zasadniczą część rozprawy stanowią rozdziały: Wstęp, Cel pracy i hipotezy badawcze, Materiał i zastosowane metody badawcze, Wyniki i dyskusja, Wnioski, Literatura, Streszczenie (zawierające także słowa kluczowe), Summary (w jęz. angielskim, także ze słowami kluczowymi). Pracę kończą: wykaz tabel i wykresów, aneksy do rozprawy doktorskiej zawierające

oświadczenia współautorów oraz publikacje wchodzące w skład rozprawy, a także zestawienie pozostałego dorobku naukowego.

:

### **3. Ocena merytoryczna cyklu publikacji oraz całości pracy**

Rozdział Wstęp obejmuje przegląd aktualnego stanu wiedzy z zakresu tematyki dysertacji. Na początku Autor dokonuje charakterystyki aktualnych trendów dotyczących suplementów diety, wskazując na coraz powszechniejsze wykorzystanie przez współczesnych konsumentów różnego rodzaju preparatów. Jednym z nich jest kolagen, który z jednej strony jest składnikiem suplementów diety, a z drugiej – stosowany jest jako dodatek funkcjonalny w produkcji różnego rodzaju produktów żywnościowych. Warto także zauważyć, że w związku z doniesieniami dotyczącymi problematycznej jakości obecnych na rynku suplementów diety, zastosowana w niniejszej pracy metoda wzbogacania kolagenem produktów spożywczych wydaje się być lepszym rozwiązaniem dla konsumenta niż przyjmowanie tego składnika w formie preparatów aptecznych. W dalszej części tego rozdziału szczegółowo omówiono funkcje biologiczne kolagenu w organizmie człowieka, źródła jego pozyskiwania do których zalicza się przede wszystkim produkty uboczne z przetwórstwa mięsa i ryb, a także jego zastosowanie w przemyśle spożywczym. Warto także podkreślić, że jest to zgodne z aktualnymi trendami dotyczącymi maksymalnego zagospodarowania do celów żywieniowych odpadów i produktów ubocznych. Ciekawym wątkiem tego rozdziału jest także porównanie właściwości odżywczych i technologicznych kolagenu natywnego i hydrolizowanego, gdyż oba te preparaty były przedmiotem badań Autora. Kolejną część Wstępu poświęcono tematyce żywności fermentowanej i probiotycznej, formułując tezę, że produkty fermentowane cieszą się dużym zainteresowaniem konsumentów – zwłaszcza tych z nietolerancją laktozy. Moim zdaniem jest to teza kontrowersyjna, bowiem spośród standardowych fermentowanych produktów mlecznych jedynie sery dojrzewające praktycznie nie zawierają laktozy. W pozostałych produktach z tej grupy tj. w mlekach fermentowanych poziom tego cukru obniża się o około 20-30%, a gdy weźmie się pod uwagę, że niekiedy produkuje się je z mleka zagęszczonego, to okazuje się, że poziom laktozy jest podobny lub tylko częściowo obniżony w porównaniu z mlekiem niefermentowanym. W tym kontekście błędna jest także teza zawarta w końcowej części Wstępu (str. 20), że „Probiotyczne mleko fermentowane może być przeznaczone dla osób z nietolerancją laktozy, gdyż w procesie fermentacji następuje hydroliza większości laktozy...”. Raczej należy przychylić się do tezy zwartej na stronie 14, że probiotyki i żywność je zawierająca może przyczynić się do łagodzenia objawów nietolerancji laktozy. Kolejna uwaga dotyczy użytego pojęcia „termin ważności” w stosunku do produktu spożywczego (str. 20). Choć jest to pojęcie zrozumiałe i powszechnie stosowane w języku potocznym, to w literaturze fachowej raczej powinno się używać określenia zgodnego w obowiązującym prawie żywnościowym tj. „termin przydatności do spożycia”. Pomimo tych uwag wysoko oceniam tę część opracowania w której Autor kompleksowo charakteryzuje problematykę zastosowania probiotyków jako składników żywności, nie tylko podając przykłady ich korzystnego wpływu na zdrowie człowieka, ale także precyzyjnie opisując mechanizmy tego oddziaływania. Można natomiast ewentualnie zadać pytanie: czy Autor zna ewentualne doniesienia dotyczące zagrożeń wiążących się z stosowaniem probiotyków czy też ich negatywnego oddziaływania na organizm człowieka? Kończącą tematyką poruszaną we Wstępie jest

wykorzystanie mleka owczego i koziego. Autor dokonuje precyzyjnej charakterystyki składu, wartości odżywczej i przydatności technologicznej obu tych rodzajów mleka, głównie w porównaniu do mleka krowiego. Dlatego tabela 1, w której umieszczono precyzyjne dane dotyczące składu jedynie mleka owczego i koziego, byłaby pełniejsza gdyby zawierała także parametry typowe dla mleka krowiego. Nieprecyzyjne jest natomiast określenie, że zainteresowanie mlekiem kozim i owczym wynika m. in. z ich lepszej strawności; twierdzenie to raczej powinno dotyczyć wyłącznie mleka koziego, które zawiera mniej  $\alpha_1$ -kazeiny w porównaniu z mlekiem krowim, co zresztą Autor twierdzi w dalszej części tego rozdziału. Biorąc pod uwagę różnice w składzie trudno zgodzić się także z tezą, że mleko owcze może być alternatywą dla mleka krowiego i preparatów dla żywienia niemowląt. Wyjaśnienia wymaga stwierdzenie (str. 18), że trudności z uzyskaniem odpowiednio zwartej konsystencji żelu mleka koziego wynikają z małej zdolności buforowej tego surowca. Oczywistym błędem językowym jest z kolei stwierdzenie zawarte na str. 17, że „mleko owcze jest alternatywnym źródłem mleka krowiego...”. Wyjaśnienia wymaga także stwierdzenie zawarte na str. 18, że mleko kozie ma niższą zawartość lotnych kwasów tłuszczowych przy jednoczesnej wyższej zawartości średnio- i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (w domyśle: w porównaniu z mlekiem krowim). Rodzi się pytanie, które konkretnie kwasy tłuszczowe mleka zalicza się to wyżej wymienionych grup.

Biorąc jednakże pod uwagę całość treści rozdziału Wstęp uważam, że w oparciu o najnowszą literaturę przedmiotu Doktorant w sposób całościowy i dogłębny nakreślił aktualny stan wiedzy z zakresu tematyki pracy oraz uzasadnił podjętą problematykę badań.

W rozdziale „Cel pracy i hipotezy badawcze” zdefiniowano jeden główny cel naukowy dobrze precyzujący założenia podjętych badań. Jedyną uwagę można mieć do stwierdzenia, że celem było określenie przeżywalności szczepów w układzie pokarmowym, podczas gdy faktycznie badania wykonywano *in vitro* w modelowych warunkach trawienia. Należy jednakże zauważyć, że formułując cele szczegółowe i hipotezy badawcze doprecyzowano stosowaną metodę badań. Realizację celu głównego oparto na 4 celach szczegółowych, które stanowią jego rozwinięcie i ukazują logiczne uszeregowanie podjętych etapów badań. Jedynie cel czwarty powinno się doprecyzować, gdyż zastosowano w nim skrót myślowy: „określenie przeżywalności komórek bakterii metodą trawienia *in vitro*”. Za trafne uważam sformułowanie dodatkowego celu użytecznego, podkreślającego charakter aplikacyjny przeprowadzonych badań.

W kolejnej części tego rozdziału przedstawione są cztery hipotezy badawcze. W przeciwieństwie do opisanych powyżej celów, treść hipotez sprawia wrażenie, że zostały one sformułowane *ex post*, niejako z konieczności na potrzeby opracowanej dysertacji. Pierwsze 3 hipotezy dotyczą 1. oraz 2. publikacji i można odnieść wrażenie, że sformułowane je nieco sztucznie i zbyt ogólnie, dzieląc sumaryczny zakres badań dwóch publikacji na 3 części. W hipotezach tych założono jedynie wpływ określonych czynników na badane parametry, nie uwzględniając kierunku tych zmian, co moim zdaniem, byłoby bardziej trafne. Hipoteza 1. nie dość, że z wyżej opisanych powodów jest zbyt ogólna, to dodatkowo bardzo szeroka, bo dotyczy wpływu rodzaju i dawki kolagenu na wszystkie 11 ocenianych parametrów fizykochemicznych fermentowanego mleka owczego i koziego. Oprócz wskazania oczekiwanego kierunku zmian niewątpliwie warto byłoby uwzględnić w hipotezach także stabilność przechowalniczą mleka fermentowanego, stawiając np. tezę poprawy stabilności przechowalniczej pod wpływem zastosowanych dodatków kolagenu, tym bardziej, że zgodnie z celem pracy

czas przechowywania był czynnikiem badanym i jego wpływ jest uwzględniony w omówieniu wyników. W hipotezie 2. uwzględniono wpływ rodzaju i dawki kolagenu na wzrost i przeżywalność bakterii probiotycznych, a więc dotyczy wpływu czynników: rodzaj i dawka kolagenu oraz czas przechowywania, w tym przypadku zabrakło wspomnianego wyżej jednoznacznego określenia np. pozytywnego oddziaływania kolagenu na liczebność określonych szczepów bakterii probiotycznych w mleku fermentowanym lub wskazania jako kryterium określonej liczby bakterii np.  $10^7$  jtk/g podczas całego okresu przechowywania. Nie do końca zrozumiałe jest sformułowanie hipotezy 3. opartej na wycinku badań nie obejmującym w ogóle produktów z dodatkiem kolagenu – a więc głównego czynnika uwzględnionego w temacie dysertacji. Uwzględnienie tego czynnika w hipotezie dotyczącej jakości sensorycznej byłby szczególnie istotne chociażby z punktu widzenia konsumenta. Podsumowując: publikacje 1. i 2. mają bardzo podobny układ doświadczenia, obie obejmują badanie wpływu tych samych czynników na te same parametry, różniąc się materiałem badawczym. Moim zdaniem zasadne byłoby więc sformułowanie oddzielnych hipotez dla każdej z tych dwóch publikacji. Hipotezę 4 sformułowano logicznie w oparciu o trzecią z cyklu publikację, jednakże warto byłoby ją doprecyzować wskazując na, spodziewaną zapewne, poprawę przeżywalności bakterii probiotycznych pod wpływem stosowanych preparatów kolagenowych.

Rozdział „Materiał i zastosowane metody badawcze” zawiera logiczny i precyzyjny opis kolejnych etapów pracy badawczej odpowiadających publikacjom stanowiącym dysertację. Należy pozytywnie odnieść się do szczegółowego opisu materiału badawczego i zastosowanych do jego analizy metod badań, z przyporządkowaniem do określonych publikacji. Zrozumienie układu doświadczenia ułatwia zawarty w pracy schemat graficzny. Treść tego rozdziału jest przejrzysta i ułatwia całościowe zapoznanie się z przebiegiem pracy doświadczalnej opisanym w trzech oddzielnych publikacjach. Niemniej po jego lekturze nasuwa się kilka uwag i pytań. W jakim celu stosowano podwójną pasteryzację mleka oraz dlaczego pierwsza pasteryzacja była przeprowadzana z większym efektem termicznym niż druga? W praktyce przemysłowej stosuje się często repasteryzację mleka, jednakże zazwyczaj ma to miejsce wtedy gdy jest konieczność dłuższego przechowywania surowca przed przetwórstwem. W tej sytuacji zazwyczaj pierwsza obróbka termiczna przebiega w łagodniejszych warunkach niż druga, docelowa pasteryzacja stosowana podczas produkcji określonych wyrobów. W opisie procesu homogenizacji jest informacja, że stosowano ciśnienie 20 MPa, podczas gdy wykorzystywano urządzenie do homogenizacji obrotowej (CAT UNIDRIVE X 1000D), co jest prawdopodobnie błędem powielonym z publikacji 3. W pozostałych dwóch publikacjach wskazano inny typ urządzenia również podając że proces miał charakter ciśnieniowy. Jaką metodą i przy użyciu jakiego sprzętu przeprowadzano więc tę operację technologiczną? Wyjaśnienia wymaga także metoda przygotowania *inoculum*. W pracy ani w publikacjach źródłowych nie określono jaką konkretnie formę miały otrzymane od dostawców kultury, ale w praktyce szczepionki probiotyczne występują jako tzw. startery skoncentrowane do bezpośredniego zaszczepiania mleka przerobowego. Dlaczego zatem stosowano tzw. aktywację która *de facto* polegała na otrzymywaniu zakwasów roboczych i jakie medium do tego wykorzystano? Jest to o tyle istotne, że stosowano stosunkowo duży, bo 5% dodatek takiego *inoculum*, co mogło wpłynąć na skład otrzymywanych produktów. Uzasadnienia wymaga także zastosowana temperatura 40 °C, choć dla większości bakterii

probiotycznych optymalna wartość tego parametru to 37 °C, jaką słusznie stosowano podczas inkubacji mleka fermentowanego.

W kwestii metod badań nieprecyzyjne jest stwierdzenie w tytule podrozdziału, że oznaczano zawartość kwasu mlekowego, podczas gdy w rzeczywistości oceniano kwasowość miareczkową, którą wyrażano w jednostkach zawartości kwasu mlekowego. Podobna uwaga dotyczy opisu barwy – parametry C i h są obliczane na podstawie oznaczonych wartości parametrów  $a^*$  i  $b^*$ . Jako metodę badania tekstury wskazano test TPA – analizę profilu tekstury. Test ten polegając jednakże powinien na dwukrotnym ścisaniu próbki – ciała stałego przez element, którego wymiary powierzchni kontaktu są większe niż wymiary próbki, podczas gdy w niniejszej pracy stosowano zagłębianie sondy w skrzep mleka; tak więc poprawna nazwa metody powinna raczej brzmieć „test podwójnej penetracji”. Doprecyzowania wymaga także opis dotyczący metod obliczania przeżywalności i współczynnika przeżywalności, w którym nie zaznaczono, że liczebność komórek bakterii wstawiano do przedstawionego równania po ich zlogarytmowaniu, co jest szczególnie istotne w kwestii prawidłowego zrozumienia wartości obu parametrów. Z przedstawionego opisu oceny organoleptycznej wynika, że niestety nie przeprowadzono oceny ogólnej pożądalności, na podstawie której można byłoby wyciągnąć pełniejsze wnioski co do jakości sensorycznej badanych produktów. Ostatnia uwaga dotyczy analizy statystycznej. Opisane w publikacjach doświadczenia wykonywane były w układzie 3-czynnikowym: rodzaj i dawka kolagenu, czas przechowywania i szczep bakterii w publikacji 1. i 2. oraz szczep bakterii, typ mleka i rodzaj i dawka kolagenu w publikacji 3. Rodzi się pytanie: czy faktycznie i ewentualnie w jakim celu wykonywano analizę 1- i 2- czynnikową, skoro poprawną metodą w układzie z trzema czynnikami badanymi jest ANOVA 3-czynnikowa? W opisie w dysertacji wskazano także, że obliczano współczynnik korelacji Pearsona, podczas gdy w tekście dysertacji nie przedstawiono wyników tej analizy.

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

Rozdział „Wyniki i dyskusja” podzielono na 5 podrozdziałów; w pierwszym omówiono wyniki analizy mleka surowego, a w kolejnych czterech weryfikowano postawione hipotezy badawcze.

W podrozdziale pierwszym za nieprecyzyjne uważam stwierdzenie (str. 30, wiersz 11), że w pierwszych miesiącach laktacji kozy i owce żywione są paszą objętościową, która w istocie zawsze stanowi dawkę podstawową przeżuwaczy. Za zbędne uważam cytowanie nieobowiązującego już rozporządzenia MRiRW z 18 maja 2005 roku. W tabeli 2 w sposób nieczytelny przedstawiono dane dotyczące ogólnej liczby drobnoustrojów oraz liczby komórek somatycznych, wartości tych parametrów powinno się zaokrąglać do 1000. Za przesadne uważam stwierdzenie, że temperatura zamrażania jest kluczowym wskaźnikiem jakości i przydatności technologicznej mleka, to raczej poziom i forma białka i tłuszczu są tymi wskaźnikami. Natomiast ze względu na to, że białko i tłuszcz występują w formie odpowiednio rozproszenia koloidalnego i emulsji nie wpływają w decydującym stopniu na punkt zamrażania mleka. Uważam ponadto, że w dyskusji Autor nie odniósł się krytycznie do uzyskanych parametrów jakości mleka. Stwierdzenie, że badane mleko charakteryzowało się wysoką jakością jest zbyt wygórowane gdy weźmie się pod uwagę np. ogólną liczbę drobnoustrojów w mleku kozim lub stosunkowo niską zawartość białka w tym surowcu. Z kolei pH 6,3 mleka owczego może wskazywać na początki fermentacji przynajmniej niektórych partii, co potwierdzać mogą stosunkowo wysokie wartości

odchylenia standardowego dla tego parametru. Nie zmienia to faktu, że stosowany surowiec miał cechy umożliwiające jego wykorzystanie do przetwórstwa, choć – jak słusznie stwierdzono w streszczeniu pracy – wymagał poddania go obróbce termicznej. Nie do końca zrozumiała jest także interpretacja (str. 32, wiersz 17) zawartości tłuszczu w mleku kozim, szczególnie w aspekcie różnicy w stosunku do mleka owczego, która jest oczywista.

W kolejnym podrozdziale Autor wykonał ogromną pracę podejmując się szczegółowego omówienia wyników dwóch trójczynnиковych doświadczeń z publikacji 1. i 2. O zakresie tej części pracy świadczy zamieszczenie aż 22 podwójnych wykresów, na których przedstawiono w sumie 11 parametrów fizykochemicznych. Na uwagę zasługuje także poziom dyskusji, w której Autor nie tylko porównuje swoje wyniki z danymi z innych prac, ale także podejmuje próbę rzeczowej ich interpretacji. Do treści tego i pozostałych podrozdziałów zawierających omówienie wyników można mieć zastrzeżenie, że Autor stosuje uogólnienia, które nie zawsze są poparte wynikami analizy statystycznej zamieszczonymi na wykresach. Przykładowo, na str. 33, akapit 3 Autor stwierdza, że wszystkie mleka owcze i kozie z dodatkiem kolagenu w 1 dniu miały wyższe pH niż mleko bez tego składnika, podczas gdy dane na wykresie wskazują, że nie stwierdzono istotnych różnic między produktami OLC a OLC1,5W i OLC3,0W. W innych fragmentach poprawnie doprecyzowuje, że poziom danego parametru w określonym produkcie był wyższy, choć nie stwierdzono istotnych różnic. Uważam, że określenia iż wykazano czy stwierdzono daną zależność pomiędzy określonymi grupami doświadczalnymi zawsze powinno być poparte wynikami analizy statystycznej dotyczącej istotności różnic między średnimi. Kolejna uwaga dotyczy braku stosowania w całym rozdziale określenia „średnia” gdy omawiane są porównania międzygrupowe. Jako przykład można wskazać fragment na str. 38 gdzie w 2 akapicie jest stwierdzenie, że „...fermentowane mleko owcze z dodatkiem 1,5 % hydrolizatu cechowało się niższą zawartością kwasu mlekowego niż mleko kontrolne”; w takiej sytuacji należy użyć określenia „...niższą średnią zawartością...”, gdyż chodzi o porównanie średnich dla grup OL i OL1,5H, a nie np. OLC i OLC1,5H – bo akurat pomiędzy tymi średnimi nie stwierdzono istotnych różnic, gdyż przyjmowały one wartości odpowiednio 1,21 i 1,20. W niektórych fragmentach natomiast Autor nie ustrzegł się także błędów w opisie istotności różnic, jak np. na str. 39 w akapicie 2, gdzie stwierdza, że wszystkie grupy mleka koziego z dodatkiem 1,5W zawierały istotnie więcej kwasu mlekowego niż ich odpowiedniki kontrolne; podczas gdy dane na wykresie wskazują na brak istotnych różnic między mlekami KLA i KLA1,5W. Nieprecyzyjne, wynikające być może z błędnego przetłumaczenia jest stwierdzenie zawarte na stronie 60 (wiersz 20), że obniżenie pH powoduje tworzenie się wiązań dwusiarczkowych między  $\kappa$ -kazeiną a zdenaturowanymi białkami serwatkowymi. Wiązania te powstają w wyniku denaturacji  $\beta$ -laktoglobuliny, co ma miejsce podczas obróbki termicznej mleka i z tego względu białko to przechodzi do skrzepu kazeinowego. Kolejną ogólną uwagą jest stosowanie stwierdzenia, że nie wykazano istotnego wpływu danego czynnika w określonym zakresie porównań, pomimo, że analiza wieloczynnikowa wykazała ten wpływ. Przykład taki jest na stronie 62, w akapicie 1 jest stwierdzenie, „Dodatek kolagenu oraz hydrolizatu (...) nie wpływał na twardość mleka” natomiast dalej Autor wskazuje, że w wyniku analizy wariancji stwierdzono istotny wpływ tego czynnika. Jeśli w wyniku przeprowadzonej ANOVA stwierdza się wpływ czynnika doświadczalnego na dany parametr, to nie można tego wpływu negować podczas szczegółowego omówienia uzyskanych danych. W takim przypadku opis



powinien wskazywać, że był wpływ, ale różnice statystycznie istotne stwierdzono jedynie pomiędzy określonymi średnimi. Uwaga edytorska dotyczy niepotrzebnego moim zdaniem rozdzielania dwóch części tego samego wykresu na oddzielnych stronach. Pogarsza to czytelność opracowania, co jest szczególnie widoczne na str. 69 na której są dwie części dwóch różnych wykresów a tylko jeden opis. Na koniec podrozdziału 6.2 Autor negatywnie weryfikuje hipotezę pierwszą, stwierdzając, że rodzaj i dawka kolagenu nie wpływają na parametry fizykochemiczne mleka fermentowanego. Moim zdaniem dla uzasadnienia takiej weryfikacji zabrakło przedstawienia kompletu wyników trójczynnikowej analizy wariancji wraz z interakcjami, w tekście ograniczono się jedynie do takich parametrów jak synereza, L\*, a\*, b\* i twardość. Ponadto uważam, że dla czytelności i jasności treści przekazywanych w rozdziale Wyniki i dyskusja, korzystne byłoby odniesienie się na początku omawiania wyników poszczególnych parametrów do rezultatów analizy trójczynnikowej, a w następnej kolejności omawianie szczegółowych różnic pomiędzy określonymi grupami doświadczalnymi.

W tytule podrozdziału 6.3 określono, że badano wzrost i przeżywalność bakterii probiotycznych w celu weryfikacji kolejnej hipotezy. Uważam, że poprawniejsze byłoby stwierdzenie, że badano zmiany liczebności bakterii podczas przechowywania. Aby precyzyjnie określić wzrost bakterii podczas fermentacji należałoby zbadać ich liczbę początkową tj. bezpośrednio po dodaniu *inoculum* do mleka przerobowego, czego nie zrobiono. Co prawda w metodyce jest informacja, że *inoculum* zawierało powyżej 9 jednostek logarytmicznych bakterii w 1 g, ale nie jest to jednoznaczne z ich liczbą po dodaniu do mleka. Można jedynie się domyślać, że przy 5% dodatku poziom początkowy bakterii w mleku był o 1-2 rzędy wielkości niższy niż w *inoculum*. Nasuwają się pytania: czy badano liczbę bakterii w *inoculum*? Na jakiej podstawie oszacowano ich poziom w tym medium? W treści tego podrozdziału jest jeszcze kilka problematycznych stwierdzeń, np. na str. 75 w wierszu 15 określenie „normy spożycia aminokwasów” w stosunku do bakterii, raczej powinno być ono zastąpione pojęciem „wymagania bakterii” lub „optymalny poziom dla wzrostu”. Ponadto w akapicie 2 na tej stronie interpretując uzyskane rezultaty Autor stwierdza, że stosowany hydrolizat był bogaty w aminokwasy, co choć najprawdopodobniej jest zgodne z prawdą, to jednakże nie było przedmiotem badań. W pracy brak jest także danych odnośnie składu i charakterystyki zastosowanych preparatów pochodzących np. ze specyfikacji producentów. Mam zatem pytanie: czy Autor posiada takie dane, które potwierdzają wysoką jakość tych produktów?

Kolejny podrozdział dotyczy weryfikacji hipotezy dotyczącej wpływu rodzaju mleka i czasu przechowywania na cechy organoleptyczne i fizykochemiczne mleka fermentowanego bez dodatku kolagenu. Wyniki w tym rozdziale przedstawiono w formie wykresów pokazujących wpływ obu tych czynników, natomiast istotności różnic zaznaczono jedynie dla czynnika „czas przechowywania”. Nie wiadomo zatem na jakiej podstawie omawiany jest w tekście wpływ rodzaju mleka. Dodatkowo Autor opisuje także wpływ kolejnego czynnika – szczepu bakterii (np. str. 78, akapit 1, lub str. 81 akapit 2), pomimo że także nie zaznaczono istotności różnic w jego obrębie. Kontrowersyjna jest teza w ostatnim akapicie na str. 78, że pH mleka stopniowo spada podczas przechowywania w wyniku utleniania tłuszczu, jeśli już wskazuje się przemianę tłuszczu jako źródło zwiększania kwasowości, to raczej jest to wynik procesów lipolizy i uwolnienia wolnych kwasów tłuszczowych. Uważam także, że w opracowaniach naukowych nie powinno się stosować skrótów myślowych jak na str.79, akapit 3, że produkcja kwasu mlekowego jest wynikiem hydrolizy laktozy –

jej wynikiem są cukry proste, które są kolejno poddawane fermentacji mlekowej. Podobnie na str. 81 (akapit 2) jest rażące stwierdzenie: „...żelu kwasu mlekowego...”. W interpretacji wyników dotyczących wyższej wartości parametru  $b^*$  w mleku owczym niż kozim zabrakło, moim zdaniem, odniesienia do zawartości tłuszczu, którego znacznie więcej było w mleku owczym, a to ten składnik mleka zawiera przecież barwniki karotenowe. W omówieniu wyników dotyczących twardości jest nieprawdziwe stwierdzenie, że zawsze mleko owcze wykazywało twardszy żel niż kozie. Dane na wykresie 33 wskazują, że wielkość tego parametru dla mleka OLC i KLC w 1 dniu wynosiła odpowiednio 0,58 i 0,59 [N], co faktycznie jest zaskoczeniem biorąc pod uwagę choćby różnice w poziomie białka pomiędzy obydwoma surowcami. Z kolei dane na wykresie 35 nie wskazują na zawartą w opisie tezę, że czas przechowywania w większości przypadków zwiększał sprężystość żelu; w żadnym z mlek nie stwierdzono istotnych różnic uprawniających do takiego wniosku, co – jak wyżej wspomniano – powinno być podstawą do tego rodzaju stwierdzeń. Na stronie 88 jest błędna informacja, że mleko kozie cechuje się mniejszą średnicą miceli kazeinowych niż mleko krowie, jest to być może błąd językowy, gdyż na str. 82 Autor z kolei poprawnie wskazuje na odwrotną zależność. Błędem językowym, jak sądzę, jest także zawarte w tym zdaniu określenie „średnica azotu niebiałkowego”. W konkluzji tego podrozdziału Autor odrzuca hipotezę 3. Podobnie jak w poprzednich dwóch hipotezach nie przedstawiono jednakże wyników całościowej analizy statystycznej uzasadniającej tę decyzję.

Ostatni podrozdział dotyczy omówienia wyników 3 publikacji i weryfikacji 4 hipotezy. Moim zdaniem szkoda, że w dysertacji zaprezentowano tylko część wyników tej wartościowej pracy, doskonale uzupełniającej badania zawarte w dwóch poprzednich pracach z cyklu. Publikacja źródłowa zawiera ciekawe dane dotyczące liczby bakterii na poszczególnych etapach symulowanego trawienia, podczas gdy w dysertacji zaprezentowano jedynie ogólną procentową przeżywalność drobnoustrojów po całościowym pasażu. Pokazanie oryginalnych wartości liczbowych byłoby także istotne, gdyż procentową przeżywalność obliczono na podstawie wartości zlogarytmowanych, co nie oddaje w pełni uzyskanych wyników badań. Ponadto na umieszczonych w tej części pracy wykresach zaznaczone istotności różnic obejmują jedynie czynnik „rodzaj mleka”, podczas gdy weryfikowana hipoteza zawiera także czynnik „rodzaj kolagenu”, a w tekście omówienia Autor słusznie odnosi się także do różnic wynikających z szczepu bakterii. Końcowy wniosek dotyczący przyjęcia hipotezy prawidłowo poparty jest opisem wyników trójczynnikowej analizy wariancji, potwierdzającej istotny wpływ wszystkich badanych czynników na przeżywalność bakterii. Zastanawia natomiast końcowe stwierdzenie dotyczące braku wpływu dawki kolagenu i hydrolizatu na badany parametr. W metodyce zawartej zarówno w dysertacji jak i w publikacji źródłowej rodzaj i dawka kolagenu traktowane są łącznie jako jeden czynnik, co z kolei nie uprawnia do powyższego wniosku, który wymagałby uwzględnienia czwartego czynnika.

Podsumowując rozdział Wyniki i dyskusja stwierdzam, że mimo pewnych nieścisłości i drobnych błędów, które z obowiązku recenzenta wskazuję, docenić należy, że Autor podjął się trudnego i ambitnego zadania szczegółowego omówienia trzech, trójczynnikowych doświadczeń, w których liczba poziomów dla poszczególnych czynników była także znacząca, bo wynosiła od dwóch do aż pięciu. Można zatem zrozumieć trudności w jasnym i klarownym omówieniu takiego zakresu materiału.

W końcowej części opracowania Autor sformułował 10 wniosków, w większości poprawnie uogólniających uzyskane rezultaty i potwierdzających realizację założonych celów badawczych. Warto

zauważyć, że we wnioskach Autor stara się uwypuklić praktyczny i aplikacyjny charakter uzyskanych wyników badań, co należy szczególnie docenić. W moim odczuciu treść wniosków można byłoby uzupełnić o ważne pod względem jakościowym wyniki dotyczące synerozy – wskazujące np. że zjawisko to w mleku owczym ogranicza dodatek hydrolizatu, oraz tekstury – w przypadku której wykazano istotny wpływ dodatku kolagenu na twardość. Choć bardzo trafny jest wniosek 4, to na końcu zawiera on nieuzasadnione, moim zdaniem, domniemanie, że wydłużenie czasu fermentacji powiązane z obniżeniem pH będzie skutkowało zwiększeniem liczby bakterii probiotycznych. Podobna kwestia dotyczy wniosku 6, w którym Autor jednoznacznie wskazuje na glicynę jako powód zwiększenia intensywności smaku słodkiego w produktach z kolagenem, choć w pracy nie oznaczano tego aminokwasu. Trzeba także dodać, że skądinąd wartościowe wnioski 6 i 7 dotyczące wpływu kolagenu i hydrolizatu na cechy organoleptyczne mleka, mają swoje źródło w publikacjach 1 i 2, jako że w treści recenzowanego opracowania niestety nie przedstawiono wyników tych badań.

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

Wyniki badań Doktorant w większości kompetentnie i wyczerpująco przedyskutował oraz zinterpretował w oparciu o poprawnie dobraną pod względem merytorycznym literaturę. W przedstawionej dysertacji wykorzystano bardzo znaczącą liczbę 196 pozycji, głównie najnowszej angielskojęzycznej literatury o zasięgu międzynarodowym, spośród których prawie wszystkie, bo aż 183 źródła pochodzą z ostatnich 10 lat. Fakt ten świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu Doktoranta w literaturze przedmiotu.

Docenić należy także aktywność naukową Doktoranta, o której świadczy zawarty w aneksie do rozprawy wykaz dotychczasowego dorobku. Poza pracami wchodzącymi w zakres dysertacji jest on autorem lub współautorem 4 publikacji o łącznej sumie 260 pkt według listy MNiSW, dwukrotnie także pełnił funkcję recenzenta artykułów naukowych. Aktywnie uczestniczy on także w konferencjach, o czym świadczy siedmiokrotne prezentowanie doniesień w formie ustnej. Jest także aktywnym członkiem zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w ramach Regionalnej Inicjatywy Doskonałości. Niewątpliwie cenne i ważne dla jego rozwoju naukowego były ponadto staże i stypendia, w których brał udział: miesięczny w Slovak University of Agriculture in Nitra oraz dwutygodniowy w University of Oradea (Romania), a także dwumiesięczne stypendium językowe z British Council.

Przestawiona do recenzji rozprawa doktorska jest wartościowym opracowaniem naukowym, co 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 naukowej wchodzących w jej skład publikacji, 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 mgr inż. Kamila Szopy pt. „Probiotyczne kozie i owcze mleko fermentowane z kolagenem” mająca formę cyklu trzech 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 Doktoranta, jak również o jego umiejętnościach samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska **Pana mgr inż. Kamila Szopy** 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 Autora do dalszych etapów postępowania doktorskiego.