

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Wojciecha Motyla

pt. „Opracowanie i wdrożenie technologii produkcji lodów bez dodatków „E” wzbogaconych w prebiotyki i probiotyki”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Piotra Dziugana, prof. uczelni oraz opiekuna naukowego z firmy Kilargo Sp. z o.o. mgr inż. Stefana Witonia na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w ramach I edycji doktoratu wdrożeniowego

### 1. Podstawa opracowania recenzji

Podstawą formalną opracowania niniejszej recenzji jest Uchwała nr 68/2021 Rady do Spraw Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej, z dnia 6 lipca 2021 oraz pismo Pani Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, dr hab. inż. Anny Diowkszej, prof. uczelni, z dnia 15 grudnia 2023.

### 2. Ocena wyboru tematu pracy i jej celu

Przedstawiona do oceny rozprawa dotyczy projektowania żywności probiotycznej. Ważnym aspektem badań w tym kierunku jest dobór właściwych mikroorganizmów. Ponadto niezwykle trudnym aspektem produkcji żywności probiotycznej jest niekorzystny wpływ procesu produkcyjnego, a następnie etapu przechowywania produktu gotowego na aktywność i przeżywalność zastosowanych mikroorganizmów. Fakt ten skłania wielu naukowców i producentów żywności do prowadzenia badań w zakresie doboru parametrów technologicznych produkcji żywności probiotycznej zawierającej żywe kultury bakterii o potwierdzonym i udokumentowanym korzystnym wpływie na organizm człowieka. Dodatkowo wprowadzenie produktów prebiotycznych stanowiących pożywkę dla bakterii daje szansę na stworzenie produktów synbiotycznych. Dane literaturowe wskazują na ogromne zainteresowanie oraz potencjał w zakresie badań realizowanych w tym obszarze. Wdrożenia rozwiązań wypracowanych w skali laboratoryjnej stanowi niestety newralgiczny i

nie do końca rozwiązany problem badawczy, który jak się okazuje jest dla wielu zakładów przemysłowych najistotniejszą przeszkodą do zweryfikowania efektywności i zasadności implementowania opublikowanych rozwiązań technologicznych. W kontekście powyższych rozważań ciekawym podejściem do rozwiązywania problemów technologicznych jest program „doktorat wdrożeniowy” w ramach którego została wykonana powyższa praca. W odniesieniu do wyżej opisanych założeń i wytycznych Doktorant dokonał trafnego wyboru tematu swojej dysertacji. Temat rozprawy doktorskiej stanowi kompleksowe podejście do opracowania procesu produkcji lodów funkcjonalnych wzbogaconych w bakterie probiotyczne oraz prebiotyki. Oprócz aspektów naukowych, wybór tematyki badawczej realizowanej w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej jest trafny i wartościowy pod względem aplikacyjnym. W świetle powyższych informacji, badania przeprowadzone przez mgr inż. Wojciecha Motyla w ramach pracy doktorskiej uznają za aktualne i uzasadnione.

### **3. Ocena formalna pracy**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest pracą o charakterze eksperymentalnym. Praca obejmuje 119 stron maszynopisu w tym 37 tabel, 30 rysunków oraz 34 fotografie. Struktura pracy jest typowa dla rozpraw naukowych i obejmuje następujące części: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, część teoretyczną, genezę i cel pracy, metodykę prowadzonych badań, wyniki badań i ich dyskusję, wnioski oraz bibliografię. Prezentowana rozprawa doktorska charakteryzuje się poprawną strukturą. Wykaz literatury obejmuje 200 pozycji. Spośród literatury naukowej 87% (175) stanowią pozycje anglojęzyczne, 9% (18) polskojęzyczne. Źródła literatury z ostatnich 5 lat stanowią 6% (12). W bibliografii Autor wykorzystał również raporty FAO/WHO, normy oraz 4 pozycje netografii. Dobór źródeł jest obszerny, obejmuje najważniejsze pozycje literatury, choć ilość prac z ostatnich pięciu lat tj. od 2018 roku powinna stanowić większy udział. W spisie literatury niektóre pozycje wymagają korekty edytorskiej, w tym m.in: pisownia nazw gatunkowych mikroorganizmów, powinna być zapisana kursywą. Sposób cytowania wymaga ujednoczenia, nazwy czasopism są pisane raz pełną nazwą, innym razem skrótami, wykaz źródeł internetowych zasadniczo powinien być umieszczony osobno.

### **4. Ocena merytoryczna pracy**

W części teoretycznej Doktorant dokonał przeglądu literatury związanej z tematyką prezentowanych badań, scharakteryzował pojęcie żywności funkcjonalnej, szczególnie skupił swoją uwagę na żywności probiotycznej. W kolejnej części przedstawił proces

technologiczny produkcji lodów spożywczych, opisując poszczególne etapy procesu niezbędne do wytworzenia produktu finalnego. Autor podkreślił i wyjaśnił rolę poszczególnych składników lodów spożywczych, opisał ich wpływ, na jakość produktu i przebieg procesu technologicznego. Następnie Doktorant skupił swoją uwagę na przedstawieniu procesu produkcji lodów probiotycznych oraz poruszył problem przeżywalności bakterii probiotycznych. Przegląd literatury zajmuje 27 stron. Autor zebrał w nim informacje, udokumentowane pozycjami literatury i wprowadzające czytelnika w podjętą w pracy tematykę badań. W tej części pracy znajdują się skróty myślowe, które wymagają przemyślenia czy przeredagowania, ich przykłady podano w uwagach ogólnych.

Kolejny rozdział stanowi *geneza i cel pracy*. W części tej Doktorant uzasadnienia celowość podjętych badań. Autor skupił się na analizie rynku lodów spożywczych, preferencjach konsumenckich, trendach rynkowych oraz potrzebie poszukiwania nowych produktów na bazie naturalnych składników, spełniających kryteria „czystej etykiety” oraz produktów funkcjonalnych. Celem badań podjętych przez mgr inż. Wojciecha Motyla było opracowanie receptury lodów naturalnych wzbogaconych w bakterie probiotyczne i substancje prebiotyczne oraz opracowanie technologii ich wytwarzania. Aby zrealizować cel pracy przeprowadzono badania produkcji lodów w skali pilotażowej, a następnie w skali półtechnicznej, w warunkach przemysłowych.

Przebieg zaplanowanych eksperymentów opisano w rozdziale *metodyka prowadzonych badań*. Autor przedstawił sposób opracowania receptur lodów naturalnych bez dodatków oznaczonych symbolami E, z użyciem żółtka jaja kurzego oraz wykorzystaniem dostępnych w przedsiębiorstwie programów obliczeniowych. Skład mieszanek lodowych został opracowany w trzech podstawowych smakach: waniliowym, czekoladowym i truskawkowym. W części eksperymentalnej Autor przedstawił przebieg procesu technologicznego przygotowania lodów bazowych oraz lodów z dodatkiem bakterii probiotycznych i prebiotyków w formie graficznej. Przedstawione schematy są czytelne i uzupełnione opisami przebiegu poszczególnych procesów i operacji jednostkowych. Jako materiał biologiczny do wzbogacenia lodów wykorzystano 6 szczepów bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* oraz 4 preparaty handlowe szczepionek dedykowane do produktów mlecznych. Do wzbogacenia lodów w prebiotyki wykorzystano 9 różnych preparatów błonnika. Kluczową częścią pracy była ocena zastosowanego w pracy materiału biologicznego obejmująca: badania przeżywalności bakterii probiotycznych w lodach po procesie technologicznym czy po przechowywaniu, badania dotyczące wykorzystania przez bakterie fermentacji mlekowej błonnika jako jedyne źródła węgla w podłożu, badania

obecności białek zimnego szoku Csp w bakteriach probiotycznych czy badania przeżywalności szczepów testowanych w warunkach pasażu jelitowego. W ocenie jakości materiału badawczego Doktorant wykorzystał metody analityczne obejmujące m.in.: analizy fizykochemiczne (m.in.; zawartość tłuszczu, suchej masy), analizy chromatograficzne (analizę profilu węglowodanowego prebiotyków) oraz analizy mikrobiologiczne lodów w trakcie przechowywania obejmujące określenie zawartości pleśni, drożdży oraz bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* oraz *Listeria monocytogenes*. Badania mikrobiologiczne przeprowadzono zgodnie z przyjętymi metodami badań i normami PN-ISO oraz Rozporządzeniami Komisji Europejskiej. Kryterium oceny jakości uzyskanych produktów była również ocena sensoryczna. Analizy wykonano w produktach gotowych oraz na poszczególnych etapach ich przechowywania. Doktorant prawidłowo dobrał metody analityczne. Uzupełnienia wymaga informacja skąd pochodziły szczepy bakterii fermentacji mlekowej (tab. 4, str. 49) oraz jakie działanie prozdrowotne przypisuje się zastosowanym w pracy preparatom handlowym (tab.5). W metodyce brak informacji na temat przeprowadzenia obserwacji mikroskopowych. Różne receptury lodów bazowych (czekoladowych) podano w metodyce i omówieniu wyników (metodyka, tab. 3, str. 45 i rozdział 6.1 i) wymaga to sprawdzenia i korekty.

Rezultaty przeprowadzonych analiz i badań Autor przedstawił w rozdziale zatytułowanym „*Wyniki badań i ich dyskusja*” w postaci 27 tabel, 20 rysunków i 32 fotografii prezentując obszerny materiał badawczy. Dokumentacja stanowi uzupełnienie treści pracy doktorskiej. W efekcie realizacji pierwszego etapu badań na podstawie obliczeń i prób pilotażowych Doktorant ustalił skład jakościowy i ilościowy lodów w trzech smakach. Uzyskane produkty w skali pilotażowej (w kubkach o pojemności 500 ml) zostały ocenione na podstawie analizy wybranych parametrów fizykochemicznych, wartości odżywczej lodów, charakterystyki mikrobiologicznej oraz oceny organoleptycznej. Przeprowadzono badania konsumenckie wytworzonych lodów z lodami konkurencji.

Przedmiotem kolejnego etapu badań była charakterystyka wybranych preparatów bakterii probiotycznych, monitorowanie ich przeżywalności podczas przechowywania w temp. -20 °C i -40°C w trakcie 72 dni przechowywania. Analiza wykazała, że bakterie probiotyczne zawarte w zakupionych preparatach handlowych okazały się odporne na warunki procesu produkcji i przechowywania, dlatego zostały one wybrane do dalszych etapów badań.

Lektura tych rozdziałów pracy nasuwa kilka uwag i pytań. W skali pilotażowej napowietrzanie mieszanki lodowej wynosiło 70% (str. 58), podczas gdy w metodyce podawane są tylko 2 wartości napowietrzania 30 i 80%. W rozdziale 6.1.3 dotyczącym

charakterystyki lodów truskawkowych, w tabeli 21 zaprezentowano wyniki dla lodów waniliowych, w tytule tabeli są lody czekoladowe (Tab. 21 str. 63). Na wykresach 10 - 18 Autor opisał oś X „czas inkubacji”, a raczej jest to „czas przechowywania” (str. 68-71), zgodnie z opisem treści tego rozdziału. Co było matrycą do przechowywania mikroorganizmów w drugim etapie pracy. Ponadto w całej pracy należałoby uporządkować ujednotwić sposób prezentowania i opisu jednostek liczebności badanych bakterii.

W dalszej części pracy oceniono zdolność wybranych preparatów bakterii probiotycznych do wytwarzania białek szoku zimnego Csp oraz przeżywalność bakterii poddanych adaptacji niskotemperaturowej (10°C). Jako krioprotektanty zastosowano masę lodową śmietankową i czekoladową. Masy cząsteczkowe białek Csp i ich punkty izoelektryczne wyznaczono na drodze analizy bionformatycznej z zastosowaniem bazy danych *NCBIprotein*. Analizę proteomu badanych bakterii wykonano metodą elektroforezy jednokierunkowej i dwukierunkowej. Dokumentacja fotograficzna dla metody elektroforezy dwukierunkowej w niektórych przypadkach jest nieczytelna, co utrudnia interpretację wyników. Wpływać na to może jak wskazał Autor metoda dezintegracji komórek, jak również efektywność metody ekstrakcji białek. Stąd pytanie czy efektywność przyjętej metody była poddana weryfikacji. W efekcie nie stwierdzono obecności białek szoku zimna dla badanych bakterii probiotycznych. Autor na str. 83 tłumaczy ten wynik zbyt małą dokładnością przyjętej metody badawczej, proszę zatem o rozwinięcie tej myśli podczas dyskusji. Odnosząc się do informacji zwartych w pracy (str.72) w jaki sposób Doktorant ocenił brak zmian wielkości komórek (fotografie 5-28) czy była to ocena wizualna ?.

W kolejnej części pracy Autor prześledził przeżywalność probiotycznych bakterii w lodach po uzyskaniu prób w skali półtechnicznej przez okres dwóch lat przechowywania.

Tytułem podsumowania tego rozdziału prosiłabym Doktoranta o wyciągnięcie wniosku, który poziom napowietrzania mieszanek lodowych miał większy wpływ na oceniany parametr. Czy parametr ten był brany pod uwagę przy wyborze mieszanek lodowych do kolejnego etapu badań dotyczącego zdolności przeżycia bakterii na nośniku lodowym w warunkach pasażu jelitowego. Który wariant został wybrany do tego etapu. Badania dotyczące zdolności przeżycia bakterii na nośniku lodowym w warunkach pasażu jelitowego przeprowadzono w obecności lizozymu, pepsyny, soli żółci, pankreatyny i niskiego pH. Badane szczepy wykazywały wysoką zdolność przeżycia w warunkach panujących w symulowanym przewodzie pokarmowym, mieszanki lodowe charakteryzowały się dobrą jakością mikrobiologiczną oraz organoleptyczną w czasie przechowywania w warunkach

chłodniczych. Czy ocena organoleptyczna lodów została wykonana po 1,5 roku czy po 2 latach, występują niezgodności pomiędzy opisem, a tabelą (str. 96 i 97, tab. 29).

Przedmiotem ostatniego etapu badań było zaprojektowanie lodów synbiotycznych z wykorzystaniem 4 mikrobiologicznych preparatów handlowych wybranych w poprzednich etapach pracy oraz prebiotyków. Kryterium wyboru prebiotyków stanowiła ocena wzrostu bakterii zawartych w preparatach handlowych na podłożu MRS zawierającym badane preparaty błonnikowe jako jedyne źródło węgla. Doktorant spośród 9 testowanych preparatów błonnikowych wybrał dwa (inulina z cykorii i błonnik owsiany) w obecności których obserwował najwyższy wzrost testowanych drobnoustrojów po 72 godzinnej hodowli. Lody synbiotyczne wytworzone z udziałem wyżej wymienionych preparatów oceniono pod względem stabilności i czystości mikrobiologicznej oraz poddano ocenie sensorycznej po 6 miesiącach przechowywania w temp. -20C na podstawie uzyskanych wyników i potwierdzono ich dobrą jakość.

Do części tej mam kilka uwag i pytań. W pkt. 6.3.4 (str.106) Doktorant opisując wyniki badań zamieszczonych w tabeli 37 przedstawia wyróżniki oceny sensorycznej lodów odnosząc się do 2 letniego okresu ich przechowywania, podczas gdy w tabeli 37 znajdują się opis wyróżników sensorycznych lodów po 6 miesiącach przechowywania. Ponadto Autor przedstawił wyniki dla lodów tylko w wariacie z 1 błonnikiem, brak wyników z drugim błonnikiem. Jaki był zatem czas przechowywania lodów synbiotycznych czy analizy sensoryczne wykonano dla wszystkich wariantów lodów. Na str. 104 w tab. 35 Autor stosuje jednostkę liczebności bakterii [jtk/mg] podczas gdy w pracy podaje w opisie liczebność bakterii na gram produktu [jtk/g].

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz otrzymanych wyników Autor sformułował 7 wniosków. Świadczą one o realizacji wyznaczonego celu badań. Niektóre wnioski wymagają korekty edytorskiej i redakcyjnej (wniosek 1, 2), czy doprecyzowania, przemyślenia (wniosek 3, 5).

W całej pracy w tym również we wniosku 1 Autor używa określenia „Lody o prostych składnikach” określenie to nie powinno być stosowane, chodzi o lody przygotowane na bazie naturalnych składników jest to określenie wystarczające i prawidłowe. We wniosku 2 sformułowanie „Lody wzbogacone o kultury bakterii probiotycznych wykazały wysoką przeżywalność mikroorganizmów procesu technologicznego wytwarzania lodów oraz ...” wymaga przereformulowania np. „Zastosowane w badaniach kultury bakterii probiotycznych wykazały wysoką przeżywalność podczas procesu technologicznego wytwarzania lodów oraz ...”. Proszę o przemyślenie wniosku 3, wyjaśnienie i doprecyzowanie co Doktorant rozumie

pod pojęciem „właściwości probiotyczne szczepów”. Wniosek 5 dotyczy wszystkich lodów w tym również synbiotycznych w odniesieniu do 2 letniego okresu przechowywania, podczas gdy w pracy prezentowano wyniki po 6 miesiącach przechowywania dla lodów synbiotycznych. Wymaga wyjaśnienia .

Przedstawione w pracy opracowane technologie lodów zostały, co podkreśla we wnioskach Autor, wdrożone w firmie Kilargo sp.o.o. Nasuwa się naturalne pytanie o wybór wariantu do wdrożenia przemysłowego. Czy wszystkie warianty, ostatecznie było ich kilkanaście (4-8 probiotyczne i 8 prebiotycznych) zostały wdrożone do oferty handlowej, czy któryś wariant/ szczep probiotyczny zasługuje zdaniem Doktoranta na wyróżnienie.

Czy badania konsumenckie przed wprowadzeniem lodów do sprzedaży dotyczyły tylko lodów bazowych czy też lodów probiotycznych czy synbiotycznych. Jak wygląda rynek konkurencji na dzień dzisiejszy.

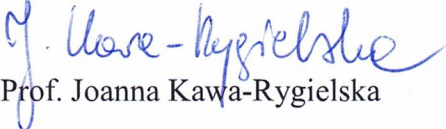
Uwagi ogólne. Z obowiązku recenzenta należy wymienić uchybienia zauważone podczas lektury niniejszej rozprawy, takie jak błędy językowe, skróty myślowe (np. „lody o prostych składnikach”, „pożytecznych związków” (str.7), „żywy mikrobiologiczny suplement diety” , „czekolada posiada szeroką gamę konsumentów” (str. 11), „inulina jest prawnie uważana za błonnik” (str.12), „żywe dodatki drobnoustrojowe” (str.13). „ dodatek tłuszczów roślinnych” (str.18), „receptura waniliowa” (str. 64), „zastosowanie obcych substancji funkcjonalnych” ( str. 65), itp.

Przedstawione w pracy uwagi nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej. Opracowanie procesu technologicznego nowych produktów o korzystnych cechach sensorycznych, zawierających żywe kultury bakterii probiotycznych po procesie produkcyjnym oraz po długim okresie ich przechowywania, w bardzo niskiej temperaturze stanowi autorskie osiągnięcie naukowe i aplikacyjne Doktoranta, które oceniam pozytywnie. Osiągnięcie to powinno również wpłynąć na przewagę konkurencyjności Firmy Kilargo sp.z o.o na rynku.

## **Podsumowanie**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pana mgr inż. Wojciecha Motyla pt. „Opracowanie i wdrożenie technologii produkcji lodów bez dodatków „E” wzbogaconych w prebiotyki i probiotyki” wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Piotra Dziugana, prof. uczelni oraz opiekuna naukowego z Kilargo Sp. z o.o. mgr inż. Stefana Witonia na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej oraz w firmie Kilargo Sp. z o.o. zawiera nie tylko badania poznawcze, ale przede wszystkim rozwiązanie technologiczne

badanego problemu. Temat rozprawy doktorskiej stanowi kompleksowe podejście do wypracowania procesu produkcji lodów probiotycznych i synbiotycznych od skali laboratoryjnej do przemysłowej. Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i stwierdzam, rozprawa ta spełnia wszystkie wymogi i kryteria zgodne z USTAWĄ z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595) oraz ROZPORZĄDZENIEM MINISTRA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim (Dz.U. z dnia 30 stycznia 2018 r. Poz. 261). Wyniki pracy mają dużą wartość aplikacyjną i wnoszą oryginalny wkład w rozwój dyscypliny technologia żywności i żywienia. Na tej podstawie wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Wojciecha Motyla do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Prof. Joanna Kawa-Rygielska