

Wrocław, 17.09.2020

## Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Marty Magdaleny Bednarek pt.: „Uwarunkowania surowcowe i technologiczne w kształtowaniu jakości miodów pitnych”, która została zrealizowana w Instytucie Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dra hab. Artura Szewgla.

### Ocena strony formalnej pracy

Formalny układ rozprawy jest typowy dla prac naukowych o charakterze doświadczalnym. Praca liczy 145 stron, a jej treść podzielono na następujące, kolejne części: streszczenie w j. polskim i w j. angielskim; spis treści; wstęp; przegląd literatury; cel i zadania badawcze; materiał badany i materiały pomocnicze; metodyka badań; przebieg doświadczeń, wyniki badań; dyskusja; wnioski; bibliografia; wykaz tabel i rycin. W rozprawie pojawia się sporo skrótów wprowadzanie w większości wyjaśnionych w tekście, ale dla przejrzystości warto byłoby umieścić ich spis i rozwinięcia na początku opracowania.

Autorka zamieściła 27 tabel i 26 rycin, które zostały odpowiednio przywołane w tekście rozprawy. Są one przygotowane starannie i bardzo dobrze uzupełniają treść pracy doktorskiej. W dysertacji zacytowano 196 prac i 15 aktów prawnych. Dobór bibliografii jest odpowiedni i obejmuje najważniejsze pozycje literatury tematu z ostatnich lat: tylko 78 z przywołanych pozycji jest sprzed 2010 roku, a tylko 6 zacytowanych prac w języku polskim.

W spisie aktów prawnych zabrakło pełnych danych tj. dziennika ustaw, numeru i pozycji. W przypadku bibliografii, w niektórych pozycjach tytuły czasopism raz pisane są z małych liter (np. Journal of food science), a raz z wielkich (np. Food Research Technology); raz skrótem (np. LWT) a raz w pełnym brzmieniu. Przy raportach zaczerpniętych ze stron internetowych, powinna być podana data dostępu do materiału źródłowego.

Pod względem edytorskim praca jest przygotowana z należytą starannością, z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o drobnych uchybieniach redakcyjnych (np. str. 36, „w temperaturze25°C”; str. 40 „amplifikacja amplifikacja DNA”; str. 60 „brzęczkę postawiono na lodzie”; str. 61, „różniły między sobą”). Są to uchybienia, które nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Podsumowując, od strony formalnej praca nie budzi moich zastrzeżeń.

## Ocena strony merytorycznej pracy

Tytuł dobrze oddaje zawartość pracy; streszczenie jest poprawnie zbudowane i zawiera niezbędne elementy. Przegląd literatury jest dobrze przemyślany, podkreśla ważkość i aktualność podjętego tematu badawczego. We wstępie przeglądu Autorka rozprawy zamieściła opis napojów fermentowanych na bazie miodu, przybliżyła rynek miodów pitnych i ich spożycie. Przedstawiła dane dotyczące wielkości rynku, jednak przywołane raporty GUS z lat 2005-2015 w zestawieniu z rokiem powstania pracy, nie obrazują aktualnej sytuacji na rynku. Szkoda, że nie udało się dotrzeć do nowszych raportów.

Następnie Doktorantka przedstawiła uregulowania prawne, jakie obowiązują w Polsce w zakresie wymagań dotyczących miodu pitnego, oraz zaprezentowała klasyfikację miodów pitnych wg BJCR, z omówieniem każdej z klas. W kolejnej części zdefiniowała kluczowe surowce oraz elementy technologiczne, które wpływają na jakość miodów pitnych: scharakteryzowała miody nektarowe i ich parametry, drożdże i ich wpływ na przebieg fermentacji; związki organiczne i nieorganiczne limitujące proces fermentacji. Określiła też kluczowe elementy technologiczne wpływające na jakość miodów pitnych tj., proces sycenia, wpływ temperatury na proces fermentacji, proces stabilizacji i klarowania. Doktorantka dokonała także charakterystyki związków występujących w miodzie (związki fenolowe, kwasy organiczne, związki lotne) wspomniano także o związkach szkodliwych występujących w miodzie pitnym. Podsumowując, przegląd literatury jest dobrze osadzony na tle osiągnięć innych badaczy, poprawnie definiuje lukę badawczą i nakreśla postawiony problem badawczy, wskazując konieczność jego rozwiązania. Tę część pracy oceniam bardzo wysoko, świadczy ona o dojrzałości naukowej Autorki rozprawy.

Za cel pracy Doktorantka przyjęła ocenę wpływu surowca oraz kluczowych parametrów na wydajność procesu fermentacji oraz na parametry jakościowe miodów pitnych. Cel pracy jest sformułowany poprawnie i jednoznacznie. Autorka wskazała siedem zadań badawczych.

W kolejnym rozdziale dokonała charakterystyki materiału badawczego, stosowanych surowców, oraz zawarła opis metodyki badań. Opisała sposób prowadzenia oznaczeń fizykochemicznych brzeczek i miodów; monitorowanie wzrostu drożdży; określenie liczby drożdży, oraz sposób izolacji czystych kultur. Następnie zaprezentowała sposób izolowania mikroorganizmów technikami biologii molekularnej. Opisy są klarowne i zawierają niezbędne informacje do oceny poprawności zastosowanych metod i technik. W punkcie 5.6.1 Autorka zamiennie stosuje „normalność” i „molowość” przy opisie eluentu do oznaczeń chromatograficznych. Moim zdaniem lepiej byłoby pozostać przy jednym sposobie określania faz. Podrozdziały 5.8.1 i 5.8.2 są zatytułowane zbyt lakonicznie odpowiednio „Wobec rodników ABTS\*” i „Wobec rodników DPPH\*.” Sądzę, że należałoby przeformułować te tytuły na bardziej oddające treść np. „Metoda ABTS” i „Metoda DPPH”.

Następnie Autorka zaprezentowała poprawnie dobrane metody statystyczne do oceny uzyskanych wyników. Do wyznaczenia parametrów krzywej wzrostu zastosowała model regresji Morgana-Mercera-Flodina, opis uzupełniła stosownym rysunkiem i równaniami, przybliżającymi sposób wyznaczania parametrów. W kolejnym podrozdziale zamieszczono opis parametrycznych i nieparametrycznych testów statystycznych oraz analiz wielowymiarowych.

Przebieg prac eksperymentalnych Doktorantka opisała wystarczająco dokładnie, dodatkowo dla przejrzystości zamieściła schematy obrazujące przyjętą koncepcję, co ułatwia jej zrozumienie. Na schemacie zamieszczonym na Ryc. 2, jak i tekście pracy Autorka rozprawy stosuje określenie „dyskryminacja miodów pitnych”. Sądzę, że trafniejszym określeniem byłoby „różnicowanie miodów pitnych”.

W kolejnym podrozdziale Autorka opisała w jaki sposób dokonała porównania profilu LC-MS miodów, nastawów i miodów pitnych odmianowych; zaprezentowała także sposób prowadzenia fermentacji brzeczek miodów odmianowych. Przedstawiła procedurę oceny wzrostu drożdży na brzeczkach miodów odmianowych wzbogacanych fosforanem diamonowym, kwasem cytrynowym i pirosiarczynem potasu. Doświadczenie to przeprowadzono z wykorzystaniem metody planowania eksperymentu (DOE) wg planu dwuwartościowego kompletnego, który dał osiem wariantów składu podłoża. Autorka w tej części określała kinetykę wzrostu drożdży, nie wskazała jednak, co było funkcją celu (maksymalizacja biomasy wyrażona poprzez odczyt wartości OD?). Wprawdzie parametry wzrostu estymowano z wykorzystaniem modelu wzrostu MMF, ale nie znalazłam opisu, który z nich był wytypowany, jako parametr maksymalizowany lub minimalizowany.

Przebieg doświadczenia zaprezentowano na Ryc. 3, którą zatytułowano „Schemat doświadczenia”. Uważam, że tytuł ten powinien być doprecyzowany, zwłaszcza, że kolejna rycina (Ryc. 4) nosi podobny tytuł „Schemat przeprowadzonych doświadczeń”. Niemniej jednak obie ryciny są bardzo pomocne w rozumieniu zaplanowanych prac i jasno wskazują ścieżkę postępowania. Autorka postawiła sobie też za zadanie opracowanie kompleksowej pożywki do suplementacji miodów trudnofermentujących. Do tego celu wykorzystowała plan centralny kompozycyjny z 27 wariantami, dla 5 zmiennych na 4 poziomach. W kolejnym kroku opisała sposób prowadzenia fermentacji brzeczek miodów syconych i niesyconych; sposób kompleksowej analizy przebiegów fermentacji nastawów na miody pitne niesycone gryczane, dołączając czytelny schemat prowadzenia doświadczeń. Zaprezentowała też sposób prowadzenia fermentacji miodu odpadowego do miodu pitnego, oraz charakterystykę miodów pitnych typu trójniak.

Podsumowując, część metodyczna opisana jest zrozumiałym językiem, zawiera niezbędne informacje pozwalające na odtworzenie prac w laboratorium, a zastosowane metody analityczne są poprawnie dobrane. Dodatkowo, przedstawione schematy ułatwiają podążanie za koncepcją autorki. Zaplanowane badania są logiczne i układają się w całość.

W kolejnym rozdziale Autorka zaprezentowała uzyskane wyniki wraz z ich omówieniem. Rozpoczęła od porównania profilu chemicznego miodów z wykorzystaniem analizy skupień, opartej na niecelowanej analizie PCA. Uzyskany dendrogram wykorzystała do oceny jakościowej surowca tj. próbek miodów pozyskanych z handlu detalicznego i wykorzystywanych w dalszych doświadczeniach. Na tej podstawie Autorka uzyskała wzorcowy dendrogram, z którym porównywała inne badane miody. Gdy testowany miód tworzył homogeniczny klaster z opracowanym wzorcowym układem, miód uznawała za odmianowy.

W podrozdziale 7.2 Autorka opisuje uzyskane wyniki podczas fermentacji brzeczek odmianowych. Fragmenty tego podrozdziału moim zdaniem powinny znaleźć się częściowo w rozdziale opisującym sposób prowadzenia doświadczeń – Metodyka (fragment „ W pierwszym z doświadczeń (...) tj. miód gryczany, rzepakowy oraz akacyjny” oraz, dwa ostatnie akapity na str. 63), oraz częściowo we przeglądzie literatury (fragment od „Miód rzepakowy cechuje się (...)” do końca akapitu.), a fragment w pierwszym akapicie rozpoczynający się od „Odnosząc się do stężenia wolnego SO<sub>2</sub> (...) do końca akapitu, powinien się znaleźć w części poświęconej dyskusji wyników.

Osiągnięciem Autorki jest identyfikacja związków o dużej intensywności różnicujących próbki miodów (analiza PCA, bez standaryzacji zmiennych i ze standaryzacją macierzy danych). Zidentyfikowała dwa kluczowe związki, które występowały w miodach pitnych w wysokim stężeniu (kwas furanokarboksylowy i cytrynian etylu). Stwierdziła także, że profil chemiczny próbek zawierających miody tego samego rodzaju, ale z różnych regionów Polski jest zbliżony. Jednak różnice między analogicznymi próbkami po fermentacji były mniejsze (bardziej skupione) niż w jej nastawach. Analiza PCA z wykorzystaniem standaryzacji potwierdziła występowanie różnic w składzie chemicznym: wyższe stężenie tyrozolu świadczy o tym, że powstaje on w trakcie fermentacji, podobnie jak wspomniane wcześniej kwas furanokarboksylowy i cytrynian etylu.

W Tabeli 8 przedstawiła parametry krzywych wzrostu uzyskane podczas ośmiu doświadczeń prowadzonych wg metody planowania eksperymentu (DOE) tj. planu dwuwartościowego kompletnego. Proszę o wyjaśnienie: czy jeśli eksperymenty oceniano wg parametrów krzywych wzrostu prezentowanych w Tabeli 8, to każdy po kolei był rozpatrywany jako funkcja celu? Eksperymenty przeanalizowano ANOVA i testem Tukeya. Mimo bardzo rozbudowanej analizy statystycznej, zabrakło mi modelu dopasowanego do uzyskanych wyników i wskazania optymalnych jego parametrów.

W punkcie 7.5 Autorka analizowała wpływ dodatku pożywki do brzeczek rzepakowej na wydajność procesu fermentacji. W opisie na str. 72 zamiast odniesienia do Tabeli 8 powinno być przywołanie Tabeli 9 i zamiast Tabeli 9 – do Tabeli 10. Mam zastrzeżenia do części opisowej analizy wyników dla doświadczeń prowadzonych wg planu centralnego kompozycyjnego. Tabela opisana jako 9 prezentuje wyniki uzyskane, gdy funkcją celu było pH, wtedy istotnie statystycznie okazały się być tylko dodatki soli

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_3\text{PO}_4$  oraz  $\text{MgCl}_2$  i  $\text{NaHSO}_4$ , wskazano na ich efekt linowy i kwadratowy. Pozostałe składniki podłoża nie miały istotnego wpływu na wartość pH. Zamieszczono ilustrację modelu w postaci wykresu odpowiedzi, ale zabrakło danych opisujących uzyskany model. Na tej podstawie można by wyznaczyć optymalne parametry dla tego modelu. Gdy analizowano, jak składniki pożywki wpływają na wydajność fermentacji etanolowej z wykorzystaniem tego samego modelu i tych samych zmiennych, okazało się, że istotny wpływ miał dodatek soli  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , oraz między kompleksem witamin i peptonem oraz witaminami i solami  $\text{MgCl}_2$  i  $\text{NaHSO}_4$ . Podobnie jak przy poprzedniej analizie nie przedstawiono równania modelu opisującego pole powierzchni odpowiedzi, ale zamieszczono jego graficzną ilustrację.

Fragment opisu na str. 74 od „Należy również podkreślić, że (...)” do końca akapitu powinien zostać umieszczony w rozdziale dyskusja wyników.

W kolejnym kroku Autorka dokonała porównania miodów pitnych syconych i niesyconych. Okazało się, że dla analizowanych parametrów największy wpływ miał rodzaj użytego miodu, a najmniejszy efekt w przypadku zawartości polifenoli wykazano dla procesu sycenia brzezki.

Autorka oceniła także przebieg fermentacji brzeczek nienasyconych miodu gryczanego i parametrów uzyskanych miodów pitnych. Skupiła się na analizie fermentacji brzeczek na bazie miodów gryczanych najmniej opisanych w literaturze przedmiotu. Dokonała identyfikacji dominujących mikroorganizmów rozwijających się podczas fermentacji. Okazało się, że ze wszystkich izolatów, 35 należało do bakterii, a 59 do drożdży. Zaproponowała model PCA, na podstawie którego stwierdziła, że na profil brzeczek wpływają drożdże *Candida metapsilosis/parapsilosis*, *Candida magnoliae*, *Candida sorbosivorans* oraz *Saccharomyces cerevisiae*. Podjęła także próbę ustalenia profili bakteryjnych z wykorzystaniem analizy PCR-DGGE, ale prążki poddane reamplifikacji nie dawały produktu reakcji PCR odpowiedniego do dalszego sekwencjonowania. Wyjaśnienie na str. 86 od „Prawdopodobnie...” do końca akapitu powinno być zamieszczone w dyskusji wyników.

W kolejnym kroku Doktorantka dokonała analizy fizykochemicznej (zawartość etanolu, ekstrakt całkowity i pH) badanych próbek nastawów gryczanych w czasie fermentacji. Następnie analizowała też zawartość związków niskocząsteczkowych. Na tej podstawie określiła profil chemiczny (LC-MS) brzezki na bazie miodu gryczanego przed i po fermentacji (30 d). Autorka przeanalizowała także profil lotnych związków obecnych w nastawach na bazie miodów gryczanych w trakcie fermentacji. Okazało się że profil chemiczny miodu pitnego wytworzonego z brzeczek zaszczepionych inokulum kwasu chlebowego znacznie odbiegał od pozostałych analizowanych próbek. Po 6 miesiącach leżakowania uzyskane miody gryczane podano ocenie sensorycznej, porównując go z miodem zakupionym w handlu detalicznym w Hiszpanii. Okazało się że miód gryczany nie uzyskał akceptacji konsumenckiej ze względu na smak w porównaniu z zakupionym miodem. W tym podrozdziale Autorka błędnie przywołuje Ryc. 10, powinna być przywołana Ryc. 19.

Miody poddano też ocenie przez panel ekspertów, a uzyskane wyniki wyróżników z badanymi miodami porównano z wykorzystaniem analizy PCA. Wyniki tej analizy potwierdziła analiza wariancji.

W kolejnym etapie Autorka próbowała poddać fermentacji miód odpadowy. W tym celu użyła dwóch szczepów drożdży. Zaproponowała kodowanie tych szczepów jako „fermentacja 1” i „fermentacja 2”, ale później w opisie stosuje kodowanie „szczep 1”, „szczep 2”. Dla przejrzystości lepiej byłoby pozostać przy jednolitym kodowaniu w całym wywodzie. Na ryc. 21 przedstawiła dopasowany model funkcji wzrostu MMF do danych doświadczalnych. Dobrze byłoby podać współczynnik dopasowania  $R^2$ .

Na str. 100, Autorka napisała „Oba szczepy różniły się statystycznie w przypadku dynamiki syntezy kwasu octowego...”. Lepszym byłoby określenie: „Dynamiki syntezy dla obu szczepów nie różniły się statystycznie...”

W ostatnim podrozdziale Doktorantka porównała wybrane trójniki dostępne na polskim rynku, ze względu na ich profil chemiczny z wykorzystaniem techniki LC-MS. Celem tego porównania było opracowanie metody statystycznej pozwalającej na określenie czynników różnicujących dane miody pod względem surowca (np. dodatek soków, ziół i innych wspomagaczy smaku), oraz brzezki miodowej syconej i niesyconej. W tym celu Doktorantka wykorzystwała analizę skupień. Uzyskała w ten sposób trzy skupienia. Stwierdziła, że niesycenie miodów pozwala na zachowanie większej ilości związków chemicznych prawdopodobnie typowych dla miodu pitnego. Autorka analizowała także całkowitą zawartość polifenoli metodą Follina-Ciocalteu, aktywność przeciwutleniającą z użyciem rodników DPPH\* i ABTS\*. Opis na str. 109, porównujący uzyskane wyniki z wynikami Sochy i wsp. (2015) i (2011), powinien znaleźć się w części Dyskusja wyników.

Podsumowując, ta część pracy została opisana bardzo logicznie i zwięźle, a moje uwagi mają charakter dyskusyjny, nie mają wpływu na ocenę końcową przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

Następnie Autorka przechodzi do dyskusji wyników, która jest bardzo przemyślana, prowadzona w sposób logiczny i bardzo rzeczowy. Autorka umiejętnie dobrała literaturę i poprawnie dokonała interpretacji własnych wyników badań, przeanalizowała oraz zestawiała z uzyskanymi przez innych autorów. Świadczy to o umiejętności ostrożnej, krytycznej analizy i interpretacji własnych wyników badań w świetle osiągnięć przedstawionych w literaturze przedmiotu.

Na zakończenie Autorka sformułowała poprawnie wnioski przedstawiające jej osiągnięcia raz z rzeczowymi do nich komentarzami.

Oceniana praca doktorska jest niewątpliwie oryginalnym dziełem naukowym, w którym Doktorantka wykazała bardzo dobre przygotowanie teoretyczne, w tym wiedzę w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie technologia żywności i żywienia, samodzielność w prowadzeniu badań naukowych, znajomość nowoczesnych metod analitycznych i badawczych; umiejętność obiektywnej oceny z

krytycznym komentarzem oraz interpretacji wyników badań. Ogromne wrażenie robi przekrój opanowanych technik laboratoryjnych, zastosowane metody analityczne jak i ocena statystyczna.

Podsumowując, przekazaną mi pracę do recenzji oceniam bardzo wysoko. Wyniki badań udokumentowano w sposób, który nie budzi wątpliwości czytelnika. Określony w pracy cel badawczy został w pełni zrealizowany. Zagadnienie właściwie umiejscowiono na tle literatury przedmiotu i metodologii. Zawarte w recenzji uwagi mają charakter głównie redakcyjny i dyskusyjny, nie mają wpływu na ocenę końcową przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

Spełnione zostały zatem wymienione w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Marty Magdaleny Bednarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego prowadzącego do otrzymania stopnia naukowego dra nauk rolniczych w zakresie technologia żywności i żywienia.

Wrocław, dnia 17.09.2020 r.



Małgorzata Krzywonos