

Olsztyn, 08.06.2022r.

Prof. dr hab. Wioletta Błaszczak
Zakład Chemicznych i Fizycznych Właściwości Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Recenzja
pracy doktorskiej mgr inż. Justyny Szczepańskiej
„Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i homogenizacji wysokociśnieniowej na
jakość skór naturalnie mętnych”,
zrealizowanej w Zakładzie Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych Instytutu
Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego- PIB w
Warszawie, pod kierunkiem dr hab. inż. Krystiana Marszałka, prof. IBPRS

Termiczne metody obróbki żywności w skuteczny sposób zapewniają otrzymanie produktu o przedłużonej trwałości do spożycia. Z drugiej strony, ilość energii dostarczona w czasie obróbki do surowca prowadzi nie tylko do redukcji mikroorganizmów i inaktywacji enzymów ale skutkuje także niepożądanymi zmianami. Te najbardziej istotne to degradacja cennych związków termolabilnych. Wysokie ciśnienia hydrostatyczne coraz częściej znajdują zastosowanie w przetwórstwie świeżych soków stanowiąc skuteczną alternatywę dla procesu pasteryzacji i sterylizacji. Redukcję mikroorganizmów i aktywności enzymatycznej uzyskuje się już w łagodnych temperaturach, zachowując jednocześnie większość związków o właściwościach prozdrowotnych. Podejmowane są także próby utrwalania świeżych soków za pomocą procesu homogenizacji wysokociśnieniowej. Udoskonalanie i poszukiwanie innowacyjnych procesów obróbki żywności umożliwiających przedłużenie jej trwałości do spożycia przy zachowaniu zawartości składników prozdrowotnych jest ważnym i aktualnym zagadnieniem.

Oceniana rozprawa stanowi cykl sześciu oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych indeksowanych w Journal Citation Reports, w latach 2020-2022. Dowodem wysokiego poziomu naukowego przedstawionych publikacji jest ich sumaryczny Impact Factor równy 36,424, a ilość punktów MNiSW wynosi 900.

W przedstawionej do recenzji dokumentacji, załączono pełne teksty publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe. Pierwsza z cyklu prac dotyczy wpływu statycznego i wielokrotnego oddziaływania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na aktywność enzymów hydrolitycznych, właściwości fizykochemiczne, w tym profil karotenoidów i potencjał przeciwutleniający soku marchwiowego w czasie przechowywania. W drugiej pracy badano profil polifenoli, aktywność oksydazy polifenolowej i peroksydazy oraz zmiany barwy soku marchwiowego poddanego obróbce wysokociśnieniowej. Kolejna, trzecia praca, poświęcona

jest wpływowi procesu wysokich ciśnień hydrostatycznych na wybrane parametry reologiczne, jakość mikrobiologiczną i właściwości fizykochemiczne soku jabłkowego w czasie przechowywania. W czwartej pracy przeanalizowano wpływ procesu paskalizacji na profil polifenoli, aktywność enzymów z grupy oksydoreduktaz i barwę soku jabłkowego. Cykl zamykają prace, tj.: publikacja piąta i szósta, w których przeanalizowano wpływ homogenizacji wysokociśnieniowej, przy różnym doborze parametrów procesu, na właściwości fizykochemiczne, reologiczne, aktywność enzymatyczną i profil badanych związków bioaktywnych, odpowiednio w soku marchwiowym i jabłkowym. Pani mgr inż. Szczepańska jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym we wszystkich wymienionych wyżej publikacjach, a Jej udział jest wiodący i wynosi od 70% do 90%. Ponadto, praca czwarta i szósta wykonane zostały w ramach projektu badawczego PRELUDIUM 17, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, w którym to Kandydatka pełni rolę kierownika.

Część I pracy, zawiera wstęp, przegląd piśmiennictwa, w którym Autorka omówiła aktualny stan wiedzy na temat poruszanych w badaniach zagadnień. W kolejnym rozdziale postawiona została hipoteza badawcza, opisany został również cel i zakres pracy. W części metodycznej przedstawiono informacje na temat odmian i pochodzenia surowca, a także warunków i parametrów przy których dokonano fizycznej obróbki otrzymanych soków. Opisano zastosowane metody analityczne. W dalszej części pracy Autorka omówiła uzyskane wyniki i przeprowadziła ich dyskusję. Pracę podsumowują obserwacje i wnioski. Przedstawiona dokumentacja zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, spis literatury (117 pozycji) i niezbędne oświadczenia, w tym współautorów publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe. W części II dokumentacji, zawarto informacje odnośnie dorobku naukowego Pani mgr inż. Justyny Szczepańskiej.

Przegląd piśmiennictwa Autorka rozpoczyna od uzasadnienia doboru materiału badawczego, wskazując, że Polska jest jednym z wiodących, producentów jabłek na świecie oraz liderem w produkcji marchwi w Unii Europejskiej. W dziewięciostronicowym przeglądzie piśmiennictwa, Kandydatka w sposób syntetyczny opisała główne związki bioaktywne jabłek i marchwi, przedstawiła charakterystykę soków i metody ich utrwalania. Przygotowując tę część rozprawy Autorka nie ustrzegła się drobnych usterek językowych. Niefortunne jest sformułowanie: „Alternatywą dla soków utrwalanych termicznie są soki niepasteryzowane – tzw. soki jednodniowe.” W dalszej części pracy, sama Autorka stwierdza, że: „...z uwagi na brak obróbki termicznej stanowią one istotne zagrożenie mikrobiologiczne, a ich krótki okres trwałości generuje wysokie koszty logistyczne...” –tak więc soki niepasteryzowane nie mogą być alternatywą dla stabilnych produktów utrwalanych termicznie. Podobnie, sformułowanie „...produkty HHP... uznawane są za tzw. nową żywność...”. Zdecydowanie lepsze byłoby określenie- produkty innowacyjne, tym bardziej, że Autorka podkreśla zasadność wprowadzania do sektora spożywczego innowacyjnych procesów technologicznych umożliwiających przedłużenie trwałości produktu i zachowanie większości związków o potencjale prozdrowotnym. Jako przykład podaje m.in. „... technikę HHP ...”. Zdaniem recenzentki, technika stanowić może sumę wszelkich działań podejmowanych po to, by wytworzyć w określony sposób wyrób gotowy. Natomiast,

ciśnienie hydrostatyczne jest jednostkowym procesem fizycznym, a więc składową złożonego procesu technologicznego. Dlatego też, zdecydowanie lepszym byłoby określenie- proces HHP. Pewną nieścisłością jest również sformułowanie: ”Jedną z takich nowych technik, stanowiących być może w przyszłości alternatywę dla HHP, jest proces homogenizacji wysokociśnieniowej...”. Wysokie ciśnienia hydrostatyczne określane są mianem „zimnej” pasteryzacji i zaliczane są do tzw.: „łagodnych” procesów technologicznych. Wobec powyższego, czy homogenizację wysokociśnieniową można zaliczyć do tzw. łagodnych procesów technologicznych i czy faktycznie może być alternatywą dla procesu paskalizacji?. W tym miejscu proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do powyższego pytania.

Kolejny rozdział pracy zawiera hipotezę badawczą, cel i zakres pracy. Zdaniem recenzentki postawiona hipoteza nie do końca wyjaśnia główny problem badawczy ponieważ wyznacznikiem stabilności soków jest nie tylko aktywność enzymatyczna ale także stabilność mikrobiologiczna. Stawiając hipotezę można założyć, że zastosowane procesy będą skutkować redukcją aktywności mikrobiologicznej - jednak takie założenie powinno znaleźć się w hipotezie badawczej. Ponadto, sama Doktorantka w celu weryfikacji hipotezy podejmuje się m.in. przeprowadzenia badań jakości mikrobiologicznej skóv świeżych, po utrwalaniu i podczas przechowywania. Uważam również, że włączenie do zakresu prac ostatniego punktu, tj.: przygotowania monotematycznego cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe jest zbędne.

Trzecia część pracy, Materiał i metody badań, zawiera informacje na temat wykorzystanych surowców i metod badawczych. Opisany został również sposób wykorzystania wysokich ciśnień hydrostatycznych i homogenizacji wysokociśnieniowej do utrwalania otrzymanych soków. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka zastosowała szeroki zakres metod analitycznych, w pełni odpowiadający profilowi prowadzonych badań. Większość informacji podana jest w sposób wyczerpujący, jednak niektóre z nich wymagają dodatkowego wyjaśnienia. W jakim celu w procedurze ekstrakcji polifenoli, metodą ultradźwiękową, zastosowano do 80% metanolu dodatek 0,1% kwasu chlorowodorowego?. Dlaczego w przypadku badania profilu polifenoli w surowym i ciśnieniowanym soku marchwiowym otrzymane wyniki wyrażano w przeliczeniu na resweratrol?. Czy zdaniem Autorki tak przedstawione wartości odzwierciedlają rzeczywiste stężenia zidentyfikowanych związków?. Czy w analizach chromatograficznych z wykorzystaniem detektora PDA, profil polifenoli oznaczono jedynie na podstawie porównania czasów retencji związków z czasami retencji użytych do badań wzorców, czy może identyfikację polifenoli oparto również o analizę widm absorpcji?. Proszę o wyjaśnienie czy czas inkubacji próbek w teście ABTS wynosił 6 godzin, czy raczej 6 minut (praca 1., 3., 5. i 6.)?.

W omówieniu wyników dokonano syntezy cyklu sześciu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe. Na podkreślenie zasługuje fakt, że opublikowane wyniki są aktualne i odzwierciedlają szeroki zakres przeprowadzonych badań podstawowych. Dużym osiągnięciem Autorki jest szczegółowa analiza profilu dominujących związków bioaktywnych jabłek i marchwi, a także ich zmian pod wpływem zastosowanych procesów i przechowywania. Po raz pierwszy w świeżym soku jabłkowym Doktorantka stwierdza obecność synapoioglukozy i umbeliferonu. Wykazuje także, że pomimo wzrostu zawartości

kwasu chlorogenowego, florydżyny i procyjanidyny B2, niektóre z zidentyfikowanych związków charakteryzowały się wrażliwością na proces ciśnieniowania. W przypadku ciśnieniowania soku marchwiowego poza spadkiem zawartości niektórych polifenoli, Autorka jednocześnie identyfikuje pięć nowo powstałych związków, w tym oleuropeinę i 4-winylosyringol. Równocześnie wykazano, że przechowywanie ciśnieniowanego soku marchwiowego skutkowało wzrostem ogólnej zawartości polifenoli – przeciwnie niż w przypadku soku jabłkowego. Bardzo proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tego zjawiska. Otrzymane w pracy wyniki pozwoliły wykazać istotne korelacje pomiędzy pojemnością przeciwutleniającą soku jabłkowego, mierzoną testem DPPH i ABTS a zawartością polifenoli. W przypadku soku marchwiowego stwierdzono istotne korelacje pomiędzy wartościami ABTS i ogólną zawartością polifenoli. Cennym uzupełnieniem otrzymanych wyników badań byłaby analiza potencjału przeciwutleniającego ekstraktów lipofilowych ciśnieniowanego soku marchwiowego i oszacowanie korelacji pomiędzy ich potencjałem przeciwutleniającym a zidentyfikowanymi karotenoidami.

Karotenoidy – to kolejna grupa analizowanych związków. Doktorantka zaobserwowała istotny wzrost zawartości karotenoidów po procesie ciśnieniowania, a obserwowane zjawisko tłumaczy m.in. zwiększoną ich ekstrahowalnością w czasie procesu. Zauważa także, że ciśnieniowane soki marchwiowe, w czasie przechowywania, charakteryzowały się różnym stopniem degradacji karotenoidów, ze szczególnym uwzględnieniem 9-Z- β -karotenu.

Po zastosowaniu homogenizacji wysokociśnieniowej, Doktorantka stwierdziła, że zmiany w profilu karotenoidów w soku marchwiowym głównie determinowane były wartością użytego ciśnienia. Natomiast aplikacja kilkukrotnych przepływów skutkowała wzrostem zawartości karotenoidów. Z kolei, przechowywanie homogenizowanego wysokociśnieniowo soku marchwiowego prowadziło do spadku sumy zawartości badanych karotenoidów.

Przeciwnie, proces homogenizacji wysokociśnieniowej nie wpłynął istotnie na profil polifenoli w soku marchwiowym i niejednoznacznie modyfikował ich profil w traktowanym soku jabłkowym. Wykazano także, że aplikacja kilkukrotnych przepływów skutkowała redukcją oznaczonej zawartości polifenoli ogółem w obu badanych sokach. W czasie przechowywania homogenizowanego wysokociśnieniowo soku jabłkowego odnotowano spadek zawartości polifenoli. Ponadto, badając korelacje pomiędzy pojemnością przeciwutleniającą homogenizowanych wysokociśnieniowo soków a zawartością badanych związków Autorka pisze: „W soku marchwiowym odnotowano korelację pomiędzy pojemnością antyoksydacyjną mierzoną testem...ABTS a zawartością karotenoidów”. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tego stwierdzenia, tym bardziej, że badane ekstrakty zawierały materiał o charakterze hydrofilowym (praca 5.).

Badając zmiany w zawartości witaminy C, Doktorantka stwierdziła, że ciśnieniowanie skutkowało istotną redukcją jej zawartości w badanym materiale. Podobnie, proces homogenizacji wysokociśnieniowej soku jabłkowego istotnie redukowało zawartość kwasu L-dehydroaskorbinowego. Autorka pisze, że aplikacja kolejnych przepływów nie miała istotnego wpływu na zawartość witaminy C - jednak to stwierdzenie jest prawdziwe jeżeli

odnosi się do soku traktowanego ciśnieniem 150 MPa, a nie do soku świeżego czy soku poddanego obróbce HPH przy ciśnieniu równym 100 MPa. Proszę Panią mgr. Szczepańską o wyjaśnienie obserwowanego zjawiska, tj.: braku istotnych zmian zawartości witaminy C w soku poddanym obróbce HPH, przy zastosowaniu kilkukrotnych przepływów, w stosunku do przepływu pojedynczego - biorąc pod uwagę fakt, że jak pisze Autorka „jest to związek wrażliwy na utlenianie”.

Naukowo cenna jest także część poświęcona badaniom jakości i trwałości przechowalniczej soków. Na uwagę zasługuje fakt, że proces ciśnieniowania już w temperaturze pokojowej skutecznie redukuje obecność mikroorganizmów i prowadzi do spadku aktywności enzymatycznej, zwłaszcza oksydoreduktaz. Przeciwnie, zastosowanie homogenizacji wysokociśnieniowej do obróbki soku marchwiowego spowodowało wzrost aktywności enzymów z grupy oksydoreduktaz i pektynometyloesterazy. O ile paskalizacja soków prowadziła do wzrostu zarówno lepkości dynamicznej jak i mętności, to soki poddane homogenizacji wysokociśnieniowej charakteryzowały się spadkiem ww. parametrów. Podczas przechowywania ciśnieniowanego soku jabłkowego Autorka stwierdziła wzrost lepkości dynamicznej oraz mętności. Podobnie, soki po procesie homogenizacji wysokociśnieniowej, w czasie przechowywania także wykazywały wzrost analizowanych parametrów. W tym przypadku obserwowane zjawisko przypisano wzrostowi aktywności mikrobiologicznej i aktywności enzymów z grupy hydrolaz.

Podkreślić należy, że otrzymane wyniki Autorka szczegółowo przedyskutowała z wynikami badań innych autorów wykorzystując w tym celu trafnie dobraną i aktualną literaturę, głównie anglojęzyczną. Świadczy to o bardzo dobrym rozeznaniu Pani magister Szczepańskiej w najnowszej literaturze przedmiotu.

Rozdział 5. pracy to obserwacje i wnioski. Pracę podsumowują 4 syntetyczne wnioski, które wynikają z przeprowadzonych badań. Jednak zdaniem recenzentki wniosek 3. i 4. jest zbyt ogólnikowy ponieważ o potencjale aplikacyjnym danego procesu decyduje energochłonność metody, a także aspekt ekonomiczny, i konsekwencje ekologiczne. Proszę Doktorantkę o odniesienie się do ww. kwestii w czasie obrony dysertacji.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana praca doktorska jest oryginalnym i wartościowym osiągnięciem naukowym, a przedstawione uwagi nie rzutują na jej wysoką wartość naukową. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma duże znaczenie nie tylko poznawcze ale także aplikacyjne, dlatego wnoszę o jej wyróżnienie. Rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, wymienione w **art.13 ust.1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U.Nr 65, poz.595, z późn. zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Proszę zatem Wysoką Radę Naukową Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego - Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie, o dopuszczenie mgr inż. Justyny Szczepańskiej do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.**

Ł. Koruda