

dr hab. inż. Małgorzata Karwowska, prof. UPL
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Zwierzęcego
Zakład Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Skromna 8, 20 – 704 Lublin

Lublin, 9 marca 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Beaty Łaszkiwicz pt. „**Wpływ wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na jakość mikrobiologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie i wytworzonych z jego udziałem produktów**” przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej

Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawą wykonania recenzji było pismo Dyrektora Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waława Dąbrowskiego w Warszawie Państwowy Instytut Badawczy prof. dr hab. inż. Artura Świergiel z dnia 19.01.2023 roku. Praca została zrealizowana w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waława Dąbrowskiego w Warszawie Państwowy Instytut Badawczy pod kierunkiem prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej. Promotorem pomocniczym rozprawy jest dr inż. Piotr Szymański. Recenzję wykonano w oparciu o Ustawę z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) na podstawie przesłanych materiałów obejmujących rozprawę doktorską w formie papierowej wraz z kopiami czterech publikacji powiązanych tematycznie i stanowiących osiągnięcie naukowe oraz oświadczeniami współautorów.

Uzasadnienie wyboru podjęcia tematu

Problematyka stosowania bioprotekcji w przemyśle mięsnym jest bardzo aktualna i budzi zainteresowanie zarówno badaczy jak i producentów żywności. Bakterie kwasu mlekowego

zyskują coraz większe zainteresowanie również wśród konsumentów preferujących żywność o przedłużonej trwałości, ale wyprodukowaną bez użycia substancji dodatkowych. Zastosowanie metody bioprotekcji daje bowiem możliwość ograniczenia/wyeliminowania substancji konserwujących (w myśl idei „*clean label*”). Najbardziej kontrowersyjnymi substancjami stosowanymi w przetwórstwie mięsa w procesie peklowania są związki azotowe. Z uwagi na ich wielokierunkowe działanie znalezienie alternatyw dla ich stosowania stanowi współczesne wyzwanie badaczy. W przetwórstwie mięsa bakterie kwasu mlekowego powszechnie stosuje się jako biokonserwanty do produkcji wędlin fermentowanych. Wykorzystanie ich w utrwalaniu produktów z udziałem mięsa oddzielonego mechanicznie jest podejściem nowatorskim i wpisuje się w kolejny istotny problem dotyczący strat i marnotrawstwa żywności. W przetwórstwie mięsnym, szczególnie w sektorze drobiarskim istotne straty mogą wynikać z technicznych ograniczeń związanych z brakiem urządzeń służących do mechanicznego oddzielenia mięsa od kości. Jeśli zakład nie posiada separatora, straty mięsa mogą wynikać z pozostałości tkanki mięsnej na kościach stanowiących części niejadalne. Istotny problem stanowi również podatność mięsa oddzielonego mechanicznie na psucie mikrobiologiczne. Poszukiwanie innowacyjnych metod przedłużania jego trwałości uważam zatem za szczególnie ważne. Podjęcie przez mgr inż. Beatę Łaszkiwicz badań dotyczących tej tematyki oceniam jako celowe i w pełni uzasadnione, zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Beaty Łaszkiwicz stanowi spójny tematycznie cykl czterech artykułów, w tym trzech oryginalnych prac twórczych o charakterze eksperymentalnym i jednej pracy przeglądowej. Prace opublikowane zostały w latach 2019 – 2021 w czasopismach naukowych zamieszczonych w wykazie czasopism MEiN, tj. *Medycyna Weterynaryjna*, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, *Poultry Science*, *Applied Sciences*. Sumaryczna wartość współczynnika *impact factor* wynosi 6,312. Suma punktów za publikacje według wykazu czasopism MEiN wynosi 330. Cykl publikacji stanowi zbiór zaplanowanych z dojrzałością naukową artykułów, które służą realizacji założonego celu pracy. Wszystkie prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego to prace współautorskie (3 – 4 autorów), jednakże w każdej z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Załączone do rozprawy oświadczenia współautorów publikacji wskazują, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wykazuje znaczący indywidualny wkład mgr inż. Beaty Łaszkiwicz w powstaniu prac. Procentowy udział własny Doktorantki w przygotowaniu publikacji został określony na 70% dla każdej publikacji. Współuczestniczyła w tworzeniu koncepcji pracy, brała udział w wykonaniu analiz, opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji.

Opracowanie ma typowy dla rozpraw doktorskich, realizowanych w oparciu o spójny tematycznie zbiór publikacji, układ podziału treści. Składa się z dwóch zasadniczych części. Pierwsza część, zawarta na 83 stronach maszynopisu, stanowi autoreferat, który obejmuje

dziwięć rozdziałów: *Źródła finansowania* (1 strona), *Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe* (2 strony), *Wstęp* (1 strona), *Przegląd piśmiennictwa* (11 stron), *Cel pracy, hipotezy badawcze i zakres pracy* (2 strony), *Materiał do badań i metody badań* (10 stron), *Wyniki i dyskusja* (28 stron), *Stwierdzenia i wnioski* (1 strona), *Spis literatury* (16 stron). Rozprawa doktorska została opatrzona streszczeniem w języku polskim i angielskim.

W drugiej części rozprawy stanowiącej Aneks zamieszczono pełne teksty publikacji stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów odnośnie ich indywidualnego wkładu w powstałe prace.

Przyjęty przez Doktorantkę układ rozprawy jest logiczny i nie budzi zastrzeżeń recenzenta.

Ocena merytoryczna pracy

Cykl publikacji stanowiących rozprawę doktorską składa się w logiczną całość konsekwentnie zaplanowanych działań, których celem było kolejno: poznanie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego jakości mięsa oddzielonego mechanicznie i metod jego utrwalania (Publikacja 1), określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na cechy fizykochemiczne i przydatność technologiczną farszów z mięsem drobiowych oddzielonym mechanicznie przechowywanych w warunkach chłodniczych (Publikacja 2), określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na cechy technologiczne i mikrobiologiczne mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie z dodatkiem azotanu sodu (Publikacja 3), ocena wpływu *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 na wybrane cechy fizykochemiczne, trwałość mikrobiologiczną i cechy sensoryczne modelowego produktu mięsnego poddanego obróbce cieplnej (Publikacja 4). Koncepcja pracy wynikała z przyjętych założeń, u podstaw których było obniżenie ilości związków azotowych jako czynnika utrwalającego produkty mięsne przy zastosowaniu bioprotekcji poprzez wprowadzenie do produktu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego. W tym kontekście, szkoda, że Doktorantka nie uwzględniła aspektu obniżania azotanu sodu w celu rozprawy doktorskiej i postawionych hipotezach badawczych.

Tytuł pracy odpowiada zamieszczonym w pracy treściom. W rozdziale Wstęp Doktorantka w sposób bardzo syntetyczny przedstawiła zagadnienia naukowe, w których osadzona jest koncepcja pracy, tj. problem strat i marnotrawstwa żywności, ograniczenie związków azotowych w przetwórstwie mięsa oraz stosowanie bioprotekcji z wykorzystaniem bakterii kwasu mlekowego. W kolejnej części pracy, zatytułowanej Przegląd piśmiennictwa, Autorka odniosła się do treści zamieszczonych w publikacji przeglądowej (Publikacji 1) włączonej do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Doktorantka scharakteryzowała mięso drobiowe oddzielone mechanicznie (pod względem cech fizykochemicznych i mikrobiologicznych) oraz zaprezentowała kierunki jego wykorzystania w przemyśle mięsnym. Wzmiankuje następnie o metodach utrwalania tego surowca prezentując dalej zastosowanie bakterii fermentacji mlekowej jako alternatywy dla stosowania substancji dodatkowych wykazujących funkcje utrwalające.

Treści zawarte w rozdziale Wstęp i Przegląd piśmiennictwa spełniają rolę uzasadnienia wyboru podjętego problemu badawczego. Wskazują na celowość podjętych badań, świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do realizacji badań w zakresie zastosowania bioutrwalania w przemyśle mięsnym. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na brak spójności w nomenklaturze związków chemicznych, na stronie 22 Autorka pisze, że „Azotan(III) sodu (...) przekształcany jest w kwas azotawy”. W pracy Doktorantka używa wymiennie pojęcia „mięso oddzielone mechanicznie” i „mięso odkostnione mechanicznie” – czy obie nazwy są poprawne? Proszę o krótki komentarz w tej sprawie podczas obrony.

Cel pracy został sformułowany jasno i zwięźle. Szkoda, że Doktorantka nie wyznaczyła celów szczegółowych, w których mógłby zostać uwzględniony aspekt obniżania azotanu sodu, któremu poświęca dość sporo miejsca w pracy.

Rozdział *Materiał do badań i metody badań* Doktorantka rozpoczęła od charakterystyki materiału badanego, prezentując go w odniesieniu do poszczególnych publikacji i zakresu poszczególnych etapów badań. Przedstawiła pochodzenie surowców oraz sposób postępowania w zakresie metodyki wykorzystywanych w poszczególnych zadaniach badawczych. Opisała również metody realizowanych analiz w zakresie cech fizykochemicznych, mikrobiologicznych i oceny sensorycznej powołując się na międzynarodowe normy ISO oraz inne źródła literaturowe. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań poddane zostały analizie statystycznej z wykorzystaniem programu STATGRAPHICS 4.1 stosując analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic między próbami weryfikowano testem Fishera.

Organizacja doświadczenia, użyty materiał i zastosowane metody badawcze w pracy świadczą o bardzo dużych umiejętnościach i warsztacie naukowym Doktorantki. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na kilka braków w opisie metod przeprowadzonych badań. W podrozdziale 6.1.4 (s. 33) nie podano warunków przechowywania kiełbas po produkcji (czy zastosowano warunki próżniowe?). W opisie metody pomiaru parametrów barwy nie podano miejsca pomiaru (na powierzchni produktów, czy na ich przekroju). Jaka była grubość prób do badań parametrów barwy?

W kolejnym rozdziale *Wyniki i dyskusja* Doktorantka w sposób syntetyczny omówiła rezultaty przeprowadzonych badań odnosząc się do każdej z publikacji badawczych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W pierwszym etapie badań poddano ocenie wpływ wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne oraz jakość mikrobiologiczną niepeklowanych farszów z mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie przechowywanych w warunkach chłodniczych. Interesujące jest wykazanie udziału użytego szczepu *Lactobacillus brevis* KL5 w procesach barwotwórczych zachodzących w mięsie niepeklowanym, co Autorka wiąże z mechanizmem syntezy NO z L-argininy przez bakterie kwasu mlekowego. W kontekście wyników przeprowadzonych analiz mikrobiologicznych Doktorantka potwierdziła aktywność przeciwdrobnoustrojową zastosowanych szczepów bakterii kwasu mlekowego w odniesieniu do *E. coli*. Zaobserwowaną po 4 dobach przechowywania najniższą liczebność *Enterobacteriaceae* w farszu z dodatkiem *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 tłumaczy produkcją bakteriocyn.

Źródło wyizolowania bakterii (środkowisko mięsne) wskazuje jako potencjalny czynnik ułatwiający adaptację *L. plantarum* SCH1 do warunków panujących w farszu z mięsem oddzielonym mechanicznie.

W kolejnym etapie badań Doktorantka podjęła próbę określenia wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne farszów z mięsa oddzielonego mechanicznie peklowanych ilością azotanu(III) sodu trzykrotnie obniżoną w stosunku do dawki dopuszczanej do stosowania w produktach mięsnych poddanych obróbce termicznej zgodnie z przepisami prawa żywnościowego. Autorka argumentuje poziom zastosowanego dodatku azotanu wynikami opublikowanymi w dostępnej literaturze oraz regulacjami przyjętymi w Danii. Uzasadnia również podjęcie badań w tym zakresie przedstawiając rolę azotanu sodu w hamowaniu rozwoju bakterii *Clostridium botulinum*. Dlaczego zatem Doktorantka nie zdecydowała się na analizę skuteczności przeciwbakteryjnej zastosowanych szczepów bakterii kwasu mlekowego w kombinacji z azotanem sodu przeciwko *C. botulinum* w farszach z mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie? Analizując wpływ zastosowanych szczepów na pH farszów Autorka stwierdziła (strona 45), że „po 7 dniach przechowywania wartość pH farszów nie różniła się istotnie”. Stwierdzenie to jest zgodne z danymi przedstawionymi w Publikacji 3 (Tabela 2), ale sprzeczne z tymi, które zostały przedstawione w autoreferacie na stronie 46 (Rys. 1a), zakładając, że średnie oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się istotnie statystycznie (brak legendy w tym zakresie dołączonej do rysunku). Wymiernym efektem badań przeprowadzonych w zakresie drugiego etapu był wybór jednego szczepu bakterii kwasu mlekowego do następnego etapu badań. Wskazano na szczep *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 podkreślając jego potwierdzone w badaniach działanie bakteriostatyczne oraz brak negatywnego wpływu na cechy fizykochemiczne farszów z mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie.

Z uwagi na aplikacyjny charakter badań, logicznym następstwem drugiego etapu badań była ocena wpływu utrwalania bakteriami kwasu mlekowego *L. plantarum* SCH1 na cechy jakościowe produktów mięsnych z udziałem mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie poddanych obróbce cieplnej. W doświadczeniu udokumentowanym czwartą publikacją cyklu, ocenie poddano wyróżniki fizykochemiczne (pH, ORP, ogólną zawartość barwników hemowych, zawartość nitrozylohemoglobiny, pozostałości azotanów(III) i (V), parametry barwy oraz wyróżniki oceny sensorycznej. Przeprowadzono również analizy mikrobiologiczne w kierunku ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, gronkowców koagulazo-dodatnich i bakterii kwasu mlekowego. Interesującym uzupełnieniem badań w tym etapie była identyfikacja bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych z produktów przy użyciu metod fenotypowych na poziomie gatunku. W kontekście uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań dość zaskakujące są wartości pozostałości azotanów(III) i azotanów(V) w produktach mięsnych. Czym można tłumaczyć tak wysokie wartości, w szczególności dotyczące pozostałości azotanów(V), obserwowane na poziomie 62,2 – 66,4 mg/kg, w świetle tego, że podczas przygotowania prób azotan(III) sodu został dodany w ilości 50 mg/kg. Bardzo proszę również o krótki komentarz w odniesieniu do zdania zamieszczonego na stronie 55 „Stosunkowo niska zawartość cukrów w MDOM mogła mieć wpływ na ograniczoną produkcję wybranych

metabolitów, w tym kwasu mlekowego, przez zastosowane LAB". Z opisu sposobu przygotowania prób nie wynika, aby podczas produkcji dodane zostały cukry.

W treści rozprawy zamieszczono 5 stwierdzeń i 4 wnioski, sformułowane na podstawie wyników przeprowadzonych badań. Ich treść jest merytorycznie poprawna i wskazuje, że Dyplomantka zrealizowała wyznaczony cel pracy.

Spis piśmiennictwa obejmuje 156 pozycji literaturowych. W zdecydowanej większości są to artykuły anglojęzyczne z ostatnich lat bezpośrednio powiązane z tematyką pracy doktorskiej. Uważam, że literatura jest adekwatna i starannie dobrana do potrzeb pracy i jednocześnie świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury światowej związanej z tematem podjętych badań. Spis literatury został przygotowany z należytą starannością.

Pod względem edytorskim przygotowana rozprawa świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Autorkę techniki redakcji tekstu naukowego. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na nieliczne uchybienia natury językowej i edytorskiej, które nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy, a jedynie powinny służyć doskonaleniu naukowego warsztatu Doktorantki.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego odnoszącego się do technologicznych możliwości zastosowania bakterii kwasu mlekowego w celu bioutrwalenia mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie i wytworzonych z jego udziałem produktów. Wykonany zakres badań oraz sposób ich prezentacji świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Dowodzą również o dużej wiedzy teoretycznej Autorki oraz znajomości metod technologicznych i analitycznych związanych z podjętym zagadnieniem.

Rozprawa doktorska mgr inż. Beaty Łaszkiewicz pt. „Wpływ wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na jakość mikrobiologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie i wytworzonych z jego udziałem produktów” spełnia wymagania zawarte w art. 13 ust. 1. Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.). Wnioskuje zatem o dopuszczenie Pani mgr inż. Beaty Łaszkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Margareta Karwowska