

prof. dr hab. inż. Grażyna Lewandowicz
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

Poznań 04.04.2017

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Violetty Schube

pt.: „**Study on the use of Quillaia extract as a thermostable egg yolk substitute in mayonnaise-like emulsions**” (“*Studia nad zastosowaniem ekstraktu Quillaia jako termostabilnego zamiennika żółtka jaja w emulsjach majonezowych*”)
wykonanej pod kierunkiem promotora **prof. dr hab. inż. Krzysztofa Krygiera**
oraz **dr inż. Katarzyny Ratusz** - promotora pomocniczego

Ocena trafności tematu i celu rozprawy

Powszechność występowania chorób cywilizacyjnych takich jak otyłość, cukrzyca nadciśnienie i miażdżyca, przy równolegle wzrastającej świadomości konsumentów dotyczącej zależności pomiędzy sposobem odżywiania a stanem zdrowia, skutkuje systematycznym zwiększaniem popytu na żywność o potencjalnym działaniu prozdrowotnym. Znaczną część rynku żywności specjalnego przeznaczenia stanowią produkty o obniżonej zawartości tłuszczu, cukru lub kalorii. Ponadto, pomimo iż egzogeny cholesterol jest odpowiedzialny maksymalnie w 30% za poziom tej substancji w osoczu krwi, ogromnym zainteresowaniem cieszą się produkty niezawierające cholesterolu. W tym kontekście przedsięwzięty przez Doktorantkę cel pracy, polegający na ocenie możliwości zastosowania ekstraktu *Quillaia* jako termostabilnego emulgatora w bezcholesterolowych wysoko- i niskotłuszczowych emulsjach majonezowych, jest uzasadniony.

Uzasadniając wybór ekstraktu *Quillaia* jako zamiennika żółtka jaja Autorka przytacza szereg informacji na temat biologicznej aktywności saponin *Quillaia* oraz tradycji stosowania w medycynie naturalnej krajów Ameryki Południowej. Równocześnie przywołuje,

obserwowany w ostatnim dziesięcioleciu trend wzrostu znaczenia produktów z tzw. „czystą etykietą”, najczęściej rozumianą jako eliminowanie substancji dodatkowych i poszukiwanie dla nich odpowiedniej alternatywy. W tym aspekcie zastąpienia żółtka jaja ekstraktem *Quillaia* będące w istocie zastąpieniem surowca będącego żywnością, substancją dodatkową dozwoloną (E 990) jest w sprzeczności z ww. ideą. Pozostałe surowce użyte do wytwarzania i stabilizacji emulsji majonezowych, tj. guma ksantanowa E 415 oraz guma guarowa E 412, są również dozwolonymi substancjami dodatkowymi. Natomiast guma kozieradki jest nowym produktem nie posiadającym nawet statusu dozwolonej substancji dodatkowej. Niemniej jednak należy wziąć pod uwagę, że aktualnie definicja czystej etykiety nie jest usankcjonowana w prawie żywnościowym i bardzo często jako czyniące zadość wymogom czystej etykiety traktowane są wszelkie surowce pochodzenia naturalnego, mimo iż w kategoriach prawnych są substancjami dodatkowymi. Stąd też odpowiednio zaprojektowana strategia marketingowa może wykorzystywać tę ideę do promowania opracowanych przez Doktorantkę emulsji. Niestety nie da się tego odnieść do chemicznie modyfikowanej skrobi – oktenylobursztynianu skrobiowego E 1450.

Literatura naukowa dotycząca tematyki koloidalnych układów rozproszonych, w tym emulsji, jest niezwykle bogata. Niemniej jednak pomimo ogromnego wysiłku badawczego podejmowanego w szeregu ośrodkach naukowych, szereg zagadnień związanych z tą tematyką nadal pozostaje niejasne. Największe kontrowersje budzi rola poszczególnych składników emulsji, w szczególności emulgatorów i stabilizatorów. Sytuację komplikuje fakt, że istnieją substancje zdolne do pełnienia obu tych funkcji. Specyfiką literatury naukowej dotyczącej emulsji jest to, że poszczególne problemy są rozważane indywidualnie i brakuje połączenia elementów badań o charakterze podstawowym z zagadnieniami aplikacyjnymi. Dlatego też podjęcie próby znalezienia korelacji pomiędzy instrumentalnie zmierzonymi parametrami fizykochemicznymi, reologicznymi i strukturalnymi emulsji a ich oceną sensoryczną jest w pełni uzasadniona i wypełnia istotną lukę w aktualnym stanie wiedzy.

Ocena formalna rozprawy

Praca pod względem formalnym stanowi obszerne opracowanie liczące łącznie 209 stron. Zasadnicza część pracy jest zredagowana w języku angielskim, jednak zawiera ona również obszerne, bo aż dwunastostronicowe, streszczenie w języku polskim. Praca zawiera

wszystkie elementy, które z formalnego punktu widzenia powinny wejść w skład rozprawy doktorskiej, w tym: przegląd literatury, sformułowanie celu pracy, opis metod realizacji zadań badawczych, omówienie i dyskusję wyników, wnioski, streszczenie oraz spis cytowanej literatury. Zasadnicza część pracy kończy się na stronie 140, a następne 66 stron stanowi niezwykle obszerny aneks, w którym zawarto znaczną część wyników. W zasadniczej części pracy przedstawiono 31 tabel i 49 rysunków, w aneksie natomiast 32 tabele i 30 rysunków. Ogółem zacytowano 232 pozycje literatury.

Merytoryczna ocena rozprawy

Myślą przewodnią ocenianej pracy było formowanie i stabilizacja emulsji przy zastosowaniu różnych substancji pełniących funkcje emulgatorów oraz stabilizatorów. Zadaniem jakie postawiła sobie Autorka było opracowanie akceptowalnych sensorycznie, standardowych i niskotłuszczowych emulsji majonezowych, w których żółtko jaja zostało zastąpione ekstraktem mydłodrzewia właściwego. Rolę substancji zagęszczająco-stabilizujących pełniły gumy: ksantanowa, guarowa i pochodząca z kozieradki. Oktenylobursztynian skrobiowy pełnił podwójną rolę – zarówno substancji emulgującej, jak i zagęszczającej.

Część literaturowa pracy precyzyjnie wprowadza w tematykę pracy. W zwarty sposób zostały w niej omówione zagadnienia dotyczące formowania oraz stabilizacji emulsji majonezowych, zarówno nisko-, jak i wysokotłuszczowych. Opisano metody badania właściwości reologicznych i tekstury majonezów, jak również przedstawiono najbardziej aktualny stan wiedzy dotyczący sensorycznego postrzegania ich tekstury. Ponadto przedstawione zostały kluczowe substancje użyte w pracy do formowania emulsji, tj. olej rzepakowy, gumy: ksantanową, guarową i kozieradki, błonnik cytrusowy oraz saponiny z mydłodrzewia właściwego. Niektóre informacje zawarte w części literaturowej pracy, jak np. definicja krytycznego stężenia micelarnego czy też opis podstaw reometrii oscylacyjnej, wydają się zbyt elementarne jak na pracę doktorską. Inne informacje natomiast mogłyby być uzupełnione jak np. opis parametrów równania reologicznego Weltmana. Ogólnie, zarówno treść części literaturowej, jak i dobór źródeł, świadczą o doskonałym rozeznaniu Doktorantki w zakresie tematyki realizowanej pracy. Do części literaturowej wkradły się też niestety nieliczne błędy merytoryczne bądź stwierdzenia, które można uznać

za dyskusyjne. I tak, opisując właściwości powierzchniowe gumy z kozieradki w kontekście jej struktury Doktorantka postuluje, że mannowe segmenty tego polisacharydu są hydrofobowe. Tymczasem polimannany, podobnie jak inne polisacharydy, są hydrofilowe. Ponadto w powoływanej przez Doktorantkę pracy [Brummer Y., Cui W., Wang Q. 2003. Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum. Food Hydrocolloids 17, 229–236] podano, iż aktywność powierzchniowa gumy z kozieradki jest związana z resztkami nieusuniętych białek. Co więcej, opublikowane we wzmiankowanej pracy izotermy adsorpcji gumy z kozieradki świadczą, że aktywność powierzchniowa oczyszczonej frakcji tego polisacharydu jest na poziomie co najwyżej natywnej skrobi ziemniaczanej, a frakcji zawierającej białka - zbliżona do słabo aktywnych skrobi modyfikowanych. Również twierdzenie dotyczące lecytyny, jakoby była emulgatorem dedykowanym emulsjom typu olej w wodzie, jest co najmniej dyskusyjne. Wartości HLB lecytyn, oscylujące wokół wartości 6, są co prawda zróżnicowane i zależne od ich niezwykle zróżnicowanej struktury, jednak raczej świadczą o przydatności do tworzenia emulsji typu woda w oleju. Ich zastosowanie w emulsjach typu olej w wodzie jest możliwe, ale wymaga specjalnej optymalizacji receptury, na co wskazują m.in. prace Małgorzaty Kowalskiej. Natomiast przypisanie typowym lipidom charakteru hydrofilowego (str. 39) traktuję jako typowy błąd edytorski.

W celu realizacji pracy Doktorantka zastosowała szereg nowoczesnych, powszechnie akceptowanych metod badawczych. Zakres badań obejmował:

- ocenę właściwości reologicznych poprzez pomiar lepkości pozornej za pomocą aparatu Brookfielda z przystawką Helipath™;
- wyznaczenie modułów sprężystości G' i plastyczności G'' , zakresu liniowej lepkośćsprężystości oraz odkształcenia w punkcie przecięcia krzywych G' i G'' mierzonych za pomocą reometru Bohlina w trybie przemieszczania amplitudą;
- wyznaczenie modułów sprężystości G' i plastyczności G'' oraz kąta przesunięcia fazowego δ mierzonych za pomocą reometru Bohlina w trybie przemieszczania częstotliwością;
- pomiar zmian lepkości przy stałej szybkości ścinania za pomocą reometru Bohlina;
- wyznaczenie krzywych płynięcia i granicy płynięcia za pomocą reometru Bohlina;

- wyznaczenie twardości, zwięzłości, spójności i adhezyjności za pomocą teksturometru;
- pomiar rozkładu wielkości cząstek fazy rozproszonej za pomocą dyfraktometru laserowego oraz obserwacji mikroskopowej;
- wyznaczenie zdolności emulgującej wszystkich trzech badanych emulgatorów oraz stabilności temperaturowej tworzonych przez nie modelowych emulsji;
- określenie stabilności emulsji w teście wirówkowym;
- oznaczenie stabilności przechowalniczej majonezów oraz odporności na procesy za- i rozmrażania;
- badania fizykochemiczne obejmujące ocenę barwy, aktywności wody, pH oraz parametrów stabilności chemicznej: liczby kwasowej i liczby nadtlenkowej;
- analizę sensoryczną w kategoriach cech postrzeganych wizualnie, tj.: połysku powierzchni, zżelowania tekstury i spójności oraz cech odczuwanych w jamie ustnej, tj.: posmaku, spoistości, rozptywalności, pełności i oleistości.

Metodyka badań została opisana w większości w sposób precyzyjny umożliwiający powtórzenie badań. Doprecyzowania wymagałoby jednak kilka elementów, m.in. rodzaj skrobi modyfikowanej, gdyż firma Ingredion oferuje całą gamę produktów, które można opisać jako oktentylobursztynian skrobiowy. Ponadto opisane na str. 59 warunki wirowania nie są precyzyjne, ponieważ do zdefiniowania przyspieszenia odśrodkowego podano samą szybkość obrotową – konieczne jest dodanie długości ramienia wirówki. Należałoby jednak podać po prostu wielokrotność przyspieszenia ziemskiego g . Odpowiedzi wymagałoby też dlaczego odporność na procesy za- i rozmrażania badano dopiero po 18 miesiącach przechowywania.

Pozostałe wątpliwości metodyczne dotyczą pomiarów reologicznych. I tak:

- Nie jest jasne w jaki sposób obliczono dane przytoczone w tabeli 10. Równanie Weltmana użyte do modelowania zmian (w czasie) lepkości przy stałej szybkości ścinania jest równaniem logarytmicznym i podawanie wartości średniej z takiego modelu jest co najmniej zaskakujące.
- Podobnie wątpliwości budzi wyznaczenie granicy płynięcia przy użyciu równania Herschey'a-Bulkley'a. Jest to równanie standardowo dostarczane z oprogramowaniem reometrów, niemniej jednak uważa się, iż wyznaczenie granicy

płynięcia za pomocą tego równania jest obciążone dużym błędem i należy raczej zastosować metody dedykowane temu zagadnieniu.

- Aparat Bohlina pracujący w trybie przemieszczania częstotliwością umożliwia również wyznaczenie lepkości pozornej. W pracy nie podano tych wartości, a byłoby ciekawe porównanie tak uzyskanych rezultatów z rezultatami zarejestrowanymi za pomocą aparatu Brookfielda. Przystawka Helipath™, zgodnie z deklaracją producenta jest dedykowana do pomiaru właściwości reologicznych żeli spożywczych. Ponieważ jednak wiskozymetr Brookfielda nie jest aparatem, w którym szybkości ścinania jest zdefiniowana istnieje niebezpieczeństwo, iż uzyskane wyniki nie będą możliwe do ponownego uzyskania przy zmienionych warunkach pomiarowych.

Otrzymane wyniki zostały przedyskutowane w odniesieniu do aktualnej literatury przedmiotu. Przede wszystkim jednak do ich analizy zostały zastosowane właściwie dobrane narzędzia statystyczne GPA (Generalised Procrustes Analysis) oraz PCA (Principal Component Analysis). Umożliwiło to znalezienie korelacji pomiędzy ogromną liczbą danych uzyskanych nie tylko z analiz instrumentalnych, ale również w drodze arbitralnych ocen paneli sensorycznych. Przytoczone dane liczbowe dotyczące wartości współczynników Pearsona pozwoliły dowieść, że pewne parametry korelują ze sobą zarówno pozytywnie jak i negatywnie w przypadku majonezów wysokotłuszczowych a zupełnie inne w przypadku niskotłuszczowych. Twierdzenie to dotyczy zarówno parametrów tekstury postrzeganych sensorycznie i mierzonych instrumentalnie, jak i parametrów reologicznych. Co ciekawe lepkość mierzona aparatem Brookfielda nie korelowała z żadnym innym parametrem. Stanowi to ważną wskazówkę dla potencjalnych użytkowników tego aparatu. Wykresy ilustrujące podobieństwa pomiędzy badanymi majonezami, obejmujące całokształt analizowanych cech, dowiodły, że wszystkie majonezy wysokotłuszczowe wytworzone z ekstraktem *Quillaia* są do siebie podobne i znacząco różnią się od majonezu kontrolnego na bazie żółtka jaja. Majonez wytworzony z zastosowaniem skrobi OSA różnił się bardzo mocno zarówno od kontroli, jak i od majonezów z ekstraktem *Quillaia*. Majonezy o obniżonej zawartości tłuszczu, wytworzone z użyciem ekstraktu z mydłodrzewia właściwego, nie były tak bardzo do siebie podobne jak pełnotłuste analogi. W tym przypadku rodzaj zastosowanego stabilizatora istotnie wpływał na zróżnicowanie ich właściwości. Niemniej jednak, ogólnie majonezy wytworzone z zastosowaniem ekstraktu *Quillaia* bardziej różniły

się od majonezu kontrolnego niż pomiędzy sobą. W tym kontekście rodzi się pytanie na podstawie jakich kryteriów Doktorantka dobierała w toku badań wstępnych receptury badanych emulsji?

Wyciągnięte wnioski są w pełni uzasadnione uzyskanymi rezultatami. Przedstawiono w nich zarówno pozytywne, jak i negatywne skutki zastąpienia żółtka jaja ekstraktem *Quillaia*. Uzupełnia je wykaz cech, które nie ulegają zmianie wskutek proponowanej substytucji. Dodatkowo w rozdziale tym Doktorantka przedstawia szczegółowe rekomendacje technologiczne i sugestie dotyczące dalszych badań.

Ocena formy językowej i technicznej strony opracowania

Oceniana praca doktorska robi wrażenie starannie przygotowanej zarówno pod względem językowym, jak i graficznym. Na szczególne uznanie zasługuje logika narracji oraz jej klarowność. Język angielski, w którym została zredagowana praca, a który nie jest przecież ojczystym językiem Autorki, zasługuje na ocenienie jako najwyższej klasy „International Standard of English”. Przyjemne graficznie rysunki niekiedy były jednak zupełnie nieczytelne ze względu na zbyt dużą ilość danych na nich zawartych. Przykładowo, na rys. 13 przedstawiono aż 14 krzywych, z których znaczna część nachodziła na siebie. Pomimo zastosowania różnych kolorów uniemożliwiało to czytelnikowi samodzielną analizę wyników. Jeszcze trudniejsze w zrozumieniu są rysunki 20-23, ponieważ nie wiadomo co oznaczają poszczególne cztery krzywe na każdym z nich. Utrudnienie w lekturze pracy spowodował również sposób prezentacji wyników w aneksie w postaci tabel generowanych przez oprogramowanie komputerów współpracujących z używaną aparaturą badawczą lub też w postaci zrzutów z ekranu tychże komputerów. Uwaga ta dotyczy również sposobu prezentowania wyników analizy statystycznej. Pomimo ogromu pracy jaki włożyła Doktorantka w statystyczne opracowanie wyników, sposób ich przedstawienia utrudnia lekturę pracy. Najpoważniejszym uchybieniem formalnym jakie wkradło się do pracy jest powtórzenie na str. 28-30 całych akapitów tekstu. Łącznie została powtórnie wklejona cała strona tekstu. Usterka ta nie zmniejsza jednak wartości naukowej pracy.

Ocena wartości naukowej i praktycznej rozprawy

Autorka samodzielnie, bardzo precyzyjnie definiuje wartość praktyczną rozprawy w rozdziale poświęconym wnioskom i obserwacjom. Osobną część tego rozdziału stanowią bowiem szczegółowe rekomendacje dotyczące możliwości aplikacyjnych. W odniesieniu do wartości naukowej należy ocenić, iż recenzowana praca ma charakter nowatorski i została zrealizowana zgodnie z aktualnym standardami pracy badawczej. W związku z powyższym gdyby została opublikowana miałyby istotny wpływ na rozwój nauki w aspekcie koloidalnych układów rozproszonych o charakterze emulsji. Teraz już tylko od Autorki i zespołu, w którym praca była realizowana zależy czy i w jakim zakresie zdecydują się ją opublikować.

Uwaga końcowa

Reasumując, wysoka wartość naukowa pracy, obejmująca wybór ciekawej i aktualnej tematyki, zastosowanie najnowocześniejszych metod eksperymentalnych, właściwie dobranych do realizacji postawionego celu, a także jej ogromne znaczenie praktyczne pozwala mi na stwierdzenie, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Violetty Schube pt.: **„Study on the use of Quillaia extract as a thermostable egg yolk substitute in mayonnaise-like emulsions”** (“Studia nad zastosowaniem ekstraktu *Quillaia* jako termostabilnego zamiennika żółtka jaja w emulsjach majonezowych”) spełnia wymagania zawarte w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz. 882). Proszę zatem Wysoką Radę Wydziału Nauk o Żywności, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Violetty Schube do jej publicznej obrony.

