

Kraków, 27.03.2014

Prof. dr hab. inż. Tadeusz Tuszyński
Katedra Technologii Fermentacji
i Mikrobiologii Technicznej
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

R E C E N Z J A

rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Pawłowskiej przedstawiona Radzie Wydziału
Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej

Tytuł pracy: Niskoalkoholowe napoje z owsa o walorach prozdrowotnych

Promotor: prof. dr hab. inż. Wojciech Ambroziak

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Diowksza

Przedstawiona do oceny praca zawiera 190 stron, w tym część teoretyczna, geneza i cele opisano na 21 stronach, materiał, metody badań i oznaczeń na kolejnych 30 stronach. Najbardziej obszerną częścią rozprawy (87 stron) jest rozdział przedstawiający wyniki badań, w którym zamieszczono 42 rysunki i 67 tabel. Dyskusja wyników obejmuje 26 stron. Końcowa część opracowania zawiera 8 wniosków, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz literaturę w liczbie 197 pozycji, w tym większość obcojęzycznych, a 87 z ostatnich 10 lat.

Rozprawa dotyczy szerokiego spektrum zagadnień ukierunkowanych na wykorzystanie owsa siewnego *Avena sativa* do otrzymywania niskoalkoholowych napojów, które mogą się charakteryzować cechami prozdrowotnymi. Właściwości te wynikają m. innymi z zawartości w owsie rozpuszczalnych frakcji β -D-glukanów. Stosunkowo szeroko opisano już w literaturze korzystne oddziaływanie składników błonnika pokarmowego owsa na pracę jelit, eliminację substancji toksycznych i obniżanie poziomu cholesterolu we krwi. β -glukany owsa wykazują także działanie antyoksydacyjne i antykancerogenne oraz stymulujące wzrost bakterii kwasu mlekowego o właściwościach probiotycznych. Polska ma odległą tradycję uprawy owsa i obecnie jesteśmy również znaczącym jego producentem w Europie. Z tego też względu każde nowe propozycje wykorzystania owsa powinny być przedmiotem szerszych

badań, które mogą być podstawą do tworzenia procedur technologicznych i produkcji w skali przemysłowej.

Owies nie był dotychczas traktowany jako odpowiedni surowiec do produkcji piwa, m. innymi z uwagi na stosunkowo niską zawartość skrobi i ekstraktu oraz odpowiednio wyższą ilość β -glukanów, kwasów tłuszczowych i białka. Należy sądzić, że ziarniaki owsa nie będą konkurencyjnym surowcem do wytwarzania piwa, mogą jednak stanowić bazę do komponowania nowej generacji napojów funkcjonalnych, raczej kompozycji mieszanych (kupażowanych).

OCENA MERYTORYCZNA

Przegląd piśmiennictwa świadczy o dobrym rozpoznaniu przez Autorkę zagadnień związanych z przedmiotem badań oraz szerszym obszarem problematyki bliskoznacznej. Doktorantka starała się zaakcentować dobre i złe strony użycia owsa do wytwarzania piwa, uwypuklić zagadnienia kontrowersyjne i nieznane dotychczas, z których umiejętnie wyprowadza własne tezy i cele pracy.

Geneza i cele pracy opisane są kompetentnie, obejmują cały proces technologiczny wytwarzania napojów alkoholowych z owsa, jak i charakterystykę ich potencjału antyoksydacyjnego, identyfikację białek oraz ocenę immunoreaktywności.

Materiał, metody badań i oznaczeń obejmują aż 30 stron i w sposób przejrzysty opisują użyte surowce, materiały, metody badawcze, procedury technologiczne i metody analityczne. Bardzo konsekwentnie scharakteryzowano użyte szczepy bakterii kwasu mlekowego, drożdży i podłoża hodowlane. W doświadczeniach stosowano 47 różnych odczynników chemicznych, w tym wzorce chromatograficzne i preparaty enzymatyczne. Autorka wykorzystwała w części analitycznej zarówno klasyczne, tzw. normatywne, jak i specjalistyczne metody analiz i oznaczeń. Na str. 30 zapisano chyba błędnie siedzibę przedsiębiorstwa: Busko-Okocim, a na str. 31, w opisie metody dotyczącej wpływu czasu namaczania na wilgotność ziarna, nie zaznaczono liczby prób równoległych. Odważano do zamaczania 25 g ziarna i co 60 min, przez 9 godz., kontrolowano wilgotność, pobierając 10 g próby. Wynikałoby z tego, że można było wykonać oznaczenie tylko dwa razy. Nie podano również źródła, z którego zaczerpnięto procedury moczenia ziarna i suszenia słodu zielonego, czy też były to własne pomysły, wzorowane na technologii słodu jęczmiennego (str. 32 i 34). Brak jest także informacji dotyczącej sposobu aktywacji i namnażania drożdży (str. 36), czy były to hodowle statyczne

(stacjonarne), czy dynamiczne (wstrząsarkowe). Szkoda, że nie opisano dokładniej jednostki aktywności α -amylazy, według metody opracowanej przez firmę Megazyme (str. 43).

Łącznie zastosowano w doświadczeniach 10 procedur badawczych i 35 różnych metod analitycznych. Wykonano m.in. oznaczenia ilościowe i jakościowe komponentów smakowo - aromatycznych metodą GC z fazy nadpowierzchniowej (headspace), głównie estrów i alkoholi fuzlowych, aldehydu octowego oraz metanolu. Może zasadne byłoby też określenie zawartości wycinalnych diketonów, szczególnie diacetylu, jak również wybranych komponentów siarki.

Na wyróżnienie zasługują oznaczenia immunoreaktywności białek pochodzących z owsa i jęczmienia, zarówno w ziarniakach tych zbóż, jak też w słodach, brzezcach i napojach. Autorka identyfikowała m.in. białka, które są aktywne w reakcjach immunoenzymatycznych. Większość wyników opisano statystycznie, wykorzystując test istotności ANOVA i test Tukeya, wyznaczając m. innymi najmniejszą istotną różnicę oraz błąd standardowy.

Wyniki badań stanowią bardzo obszerną część całego opracowania. Ich prezentacja w formie tabel i rysunków jest wprawdzie konsekwentna, ale nie ułatwia czytelnikowi bieżącego śledzenia i interpretacji przedstawionych doświadczeń, głównie z uwagi na dużą ilość wariantów technologicznych. Autorka przebadła aż 6 odmian owsa, oceniając ich przydatność do słodowania. Na podstawie badanych wyróżników wykazała, że najbardziej przydatną do słodowania jest odmiana Sławko.

Zaprezentowano pełną charakterystykę parametrów słodów uzyskanych według różnych procedur technologicznych, od ekstraktywności i siły diastatycznej poprzez zawartość białka ogółem i rozpuszczalnego, liczbę Kolbacha oraz barwę, lepkość brzezców, wolne formy azotu i aktywności β -glukanaz, łącznie z zawartością β -glukanów w słodzie i brzeccie. Dość szczegółowo przebadano i opisano wpływ różnych kultur bakterii kwasu mlekowego na jakość technologiczną słodów oraz poddano ocenie stan mikrobiologiczny ziarna po moczeniu, kiełkowaniu i suszeniu.

Wykazano, że dodatek kultur bakterii kwasu mlekowego spowodował istotny wzrost ekstraktywności słodu. Słody kwaśne charakteryzowały się znacząco wyższą siłą diastatyczną, a barwa otrzymanych brzezców była ciemniejsza niż prób kontrolnych. Ważne jest także wykazanie, że brzecki ze słodów kwaśnych odznaczały się podobną lepkością. Bardzo pozytywnie należy ocenić przeprowadzenie prób słodowania zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w mikrośłodowni przemysłowej.

W następnej kolejności charakteryzowano aktywności enzymatyczne słoćów zwykłych i kwaśnych. Wyznaczono optymalne parametry ich scukrzania i wykazano wyższą zawartość ekstraktu w brzeźkach ze słoćów kwaśnych. Obliczoną wydajność warzelnii Autorka nazwała wydajnością otrzymania brzeźki słoćkiej i wykazała różnice w zależności od temperatury scukrzania. Na podstawie analizy statystycznej wybrano optymalną temperaturę przerwy dekstrynującej. W brzeźkach oznaczono zawartość azotu ogólnego i wolnego azotu aminowego, jako istotnych wyróżników charakteryzujących nie tylko aktywność peptydaz, ale i prawidłowości przebiegu dalszych procesów. Wykazano istotny wpływ temperatury przerwy białkowej na zawartość ekstraktu fermentującego w brzeźkach. Dużą wagę przywiązała Autorka do zawartości β -glukanów, aktywności β -glukanazy w brzeźkach oraz efektywności scukrzania zacierów z zastosowaniem różnych preparatów enzymatycznych, również jako mieszanin, wykazując m. innymi synergizm ich wzajemnego oddziaływania. Scukrzanie w czasie 5 min jest wyjątkowo korzystne. Doktorantka ponownie oceniała wszystkie parametry brzeźek uzyskanych z dodatkiem preparatów enzymatycznych w 8 różnych wariantach. Uważam, że część tych doświadczeń można było pominąć bez szkody merytorycznej całego opracowania. Na pochwałę zasługuje natomiast regularna interpretacja statystyczna wyników z każdego etapu doświadczeń. Wykazano, że brzeźki uzyskane z dodatkiem preparatów enzymatycznych odznaczały się wyższą zawartością ekstraktu, azotu ogólnego i wolnego, ale następował także wzrost ich lepkości.

Kontrolę procesu fermentacji oceniano na podstawie zmian ekstraktu oraz liczby komórek drożdży, aż w 12 różnych wariantach technologicznych, różnicując m. innymi na fermentację górną i dolną. Wykazano, że piwa z owsa, w odniesieniu do piw z jęczmienia charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością białka, wolnego azotu aminowego oraz bardzo wysokim zmętnieniem od 20-70 j. EBC (piwa z jęczmienia ok. 8 j. EBC). Zauważalny jest brak oceny pienistości badanych piw i napojów przygotowanych na bazie owsa.

W końcowej części technologicznej przeprowadzono kupażowanie otrzymanych piw z sokami jabłkowymi i aroniowymi. Nie przedstawiono wyników oceny sensorycznej napojów z dodatkiem soku aroniowego. Pomysł z aronią był chyba nieuzasadniony, chociażby z uwagi na duży kontrast pod względem smaku, zapachu i barwy. Wszystkie napoje kupażowane otrzymały podobną liczbę punktów w ocenie sensorycznej. W tabeli 66, str. 125, w ostatniej pozycji kupażu nie zapisano proporcji (udziału) soku jabłkowego.

Ocena chromatograficzna składników lotnych wykazała znaczące różnice pomiędzy piwami jęczmiennymi i piwami z owsa. Pewnym zaskoczeniem mogą być też istotne zmiany stężeń komponentów lotnych między piwami górnej i dolnej fermentacji, oraz piwami

owsianymi wyprodukowanymi ze słodu tzw. kwaśnego i słodu otrzymanego bez zakwaszania bakteriami kwasu jabłkowego.

Autorka zakładała, że uzyskane napoje będą miały walory prozdrowotne, głównie z uwagi na obecność polifenoli i wysoką aktywność antyoksydacyjną, jednak ocena pod tym względem otrzymanych piw nie potwierdziła stawianych tez. Jako ostatni, bardzo ważny fragment wyników opisano immunoaktywność i skład białek owsa, głównie w aspekcie możliwości włączenia otrzymanych napojów z owsa do diety bezglutenowej. Wykazano, że białka owsa charakteryzowały się znacznie niższą immunoreaktywnością niż białka glutenowe pszenicy i jęczmienia. Udowodniono, że poszczególne etapy procesu technologicznego wyraźnie obniżają zawartość białek odpowiedzialnych za reakcje immunologiczne.

Całość prezentacji wyników wieńczy dyskusja, która jest wielowątkowa, częściowo z własną interpretacją rezultatów uzyskanych z doświadczeń wykonanych w ramach poszczególnych zadań problemowych. Z uwagi na niewielką dostępność literatury odnoszącej się do piw owsianych, Autorka chyba zbyt często odwołuje się w dyskusji do książki Kunzego z 1999 roku i innych podobnych pozycji. Dość mocno eksploatowane są również dwie inne pozycje, ale w tym przypadku zasadnie, odnoszą się bowiem do słodów z owsa.

Na str. 163 użyto niezbyt odpowiedniego określenia, zapisując, że 2M-1B i 3M-1B wchodzi w skład alkoholu pentyłowego, a na str. 169 zapisano cyt: odpowiedź immunologiczna na ziarno owsa itd., a chodzi zapewne o białka owsa.

Studiując wnikliwie niektóre fragmenty dyskusji wyników, można dostrzec wątpliwości i rozterki Autorki, ponieważ wyniki badań rodzą następne pytania. Uznaję to za dobry prognostyk dla młodego badacza, który potrafi zachować dystans do swoich osiągnięć. Ogólnie rozdział „Dyskusja Wyników” oceniam jako dobry, odnoszący się do wszystkich wątków problemowych i całego obszaru bardzo obszernych doświadczeń.

Opracowanie kończy się 8 wnioskami, które nie wykraczają poza zakres badań. Umiejętność wnioskowania co najmniej dobra, a sformułowania pod względem merytorycznym i językowym bez zastrzeżeń.

Zwykle każde opracowanie zawiera jakieś błędy lub nieścisłości różnej natury, niektóre z nich sygnalizowałem uprzednio, a teraz przedstawię kilka uwag, głównie natury językowej:

- w całym opracowaniu zapisano pełną nazwę jednostki czasu „godzina”, zamiast godz. lub literką „h”,
- str. 32, w jednym zdaniu użyto samodzielnie 5 razy literę „w”, a w tab. 1, aż 13 razy zapisano „godz.”, zamiast zaznaczyć tą jednostkę raz w podtytule,

- str. 34, brak informacji o przyjętej procedurze zamacznania,
- str. 34 i 35 zapisano „przerwa dekstynująca i przerwa maltozowa”, lepiej byłoby „przerwa na działanie α i β -amylazy”,
- str. 35, zapisano 4 razy „surowca skrobiowego”, zamiast zapisać jeden raz przed znakiem interpunkcji,
- str. 37 „poddawano godzinnemu gotowaniu”, lepiej gotowanie w czasie 1 h,
- str. 45; 5 razy użyto sformułowania „mi się”, podoba mi się, nie podoba mi się,
- str. 62, 63, 93 „dla obu temperatur”, w obu przypadkach, lepiej „w obydwu”,
- w wielu miejscach Autorka nadużywa słowo „dla”, np. dla temperatury, zamiast w temperaturze,
- opisy rysunków – brak unifikacji, raz u góry, innym razem u dołu,
- zbędne kropki po tytułach i podtytułach,
- dlaczego w opisach niektóre słowa zapisywano z dużej litery, np. Rysunek, Tabela, Schemat, dotyczy całej pracy,
- we wszystkich tabelach dotyczących interpretacji statystycznej wyników zapisywano słowo „statystka”, podobno jest to nauka zajmująca się badaniem zjawisk masowych, ale czy nie lepiej byłoby zapisać „statystyka”.

Wszystkie zauważone nieścisłości nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

PODSUMOWANIE

Doktorantka zapoznała się z obszerną literaturą przedmiotu badań, opisała genezę i sformułowała cele, logicznie zaplanowała i przeprowadziła bardzo szerokie doświadczenia, opracowała statystycznie wyniki, przedstawiła wnioski, które odnoszą się do celów pracy. Uważam, że Doktorantka w sposób istotny pogłębiła swoją wiedzę teoretyczną i umiejętności praktyczne w zakresie analitycznym, wykonując szeroki zakres oznaczeń fizykochemicznych, biochemicznych, chromatograficznych, immunologicznych i częściowo żywieniowych. Opracowanie przedstawione do recenzji jest poprawne pod względem merytorycznym, a całość utwierdza czytelnika w przekonaniu, że Autorka jest przygotowana do samodzielnego prowadzenia badań. Wydaje się, że tak kompleksowo zaplanowane i kompetentnie wykonane doświadczenia o znaczeniu podstawowym i praktycznym mogą także stanowić podstawę do wyróżnienia pracy. Stawiam wniosek w tej sprawie, jednak mam

6
pewne wątpliwości - czy większość badań była wykonana samodzielnie, czy też zespołowo w ramach dużego projektu ?

Stwierdzam, że przedstawiona do zaopiniowania dysertacja w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim, zawartych w stosownych ustawach i rozporządzeniach, i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej jednoznaczny wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Pawłowskiej do publicznej obrony.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pawłowski'.