

Kraków, 25.02.2020

dr hab. inż. Anna Ptaszek, prof. UR
Katedra Inżynierii i Aparatury Przemysłu Spożywczego,
Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Doroty Krzykowskiej pt.:

“Kontrola procesu żelowania mikropartykułowanych białek serwatkowych poprzez badanie właściwości reologicznych”

przygotowanej pod kierunkiem dr hab. inż. Tomasza Kiljańskiego
w Katedrze Inżynierii i Aparatury Procesowej.

Opinię przygotowano na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny technologia żywności i żywienia
Wydziału Nauki o Żywności

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Doroty Krzykowskiej obejmuje zagadnienia związane z żelowaniem mikropartykułowanych białek serwatkowych oraz badaniem właściwości reologicznych żeli tych białek. Rozprawa została przygotowana zgodnie z klasycznym układem, można w niej wyróżnić części odnoszące się do przeglądu literatury, opisu doświadczenia a także wyniki badań i dyskusję wyników. Praca doktorska liczy 123 strony tekstu, Autorka odwołuje się do 213 pozycji literaturowych obejmujących zarówno publikacje naukowe, normy jak i materiały szkoleniowe. Rozprawa doktorska zawiera również dodatkowe materiały w formie załączników zawierających głównie wyniki oceny sensorycznej białek partykułowanych oraz karty oceny sensorycznej.

Rozdział, który w zamierzeniu Autorki odnosi się do przeglądu literatury, obejmuje głównie zagadnienia dotyczące składu, właściwości fizykochemicznych i funkcjonalnych preparatów białek serwatkowych. Niestety ta część pracy została napisana z wykorzystaniem bardzo wielu skrótów myślowych takich jak na przykład:

- cytatał *Badania reologiczne dowodzą, że izolaty mają dużo lepsze właściwości niż koncentraty, co wynika z ich większej czystości* (strona 10),
- cytatał *Wadą tego typu białka może być gorzki posmak w zależności od liczby procesów hydrolizy, którą produkt przeszedł* (strona 13),
- cytatał *Rozpuszczalność białka zależy od równowagi termodynamicznej pomiędzy reakcjami białko-białko i białko-rozpuszczalnik (Hui, 2006)* (strona 17)

- cytata *Właściwości wewnętrzne białek* (strona 17),
- cytata *Skutkiem tego jest maksymalna wytrzymałość żelu uzyskiwana przez optymalną równowagę pomiędzy oddziaływaniami białko-białko i białko-rozpuszczalnik* (strona 34),
- cytata *Mulvihill and Kindella (1987) zasugerowali, że takie czynniki jak temperatura ogrzewania (...) wpływają na siłę żelu, (...)* (strona 32).

W opinii recenzenta, w rozprawie doktorskiej powinny znaleźć się precyzyjne sformułowania i opisy badanych zjawisk, tym bardziej, że dotyczą one istoty części doświadczalnej pracy a także dyskusji i wniosków z pracy. W części omawianego rozdziału opisano zagadnienia związane z żelowaniem białek serwatkowych, jednak i w tym przypadku recenzent odniósł wrażenie, że Autorka nie poświęciła należytej uwagi ani układom żelowym ani procesowi żelowania. Przede wszystkim brakuje jasnej definicji żelu, bowiem trudno jest za takową uznać opisy podane przez Autorkę na stronach: 19 *Żel jest stanem pośrednim między ciałem stałym a cieczą, który jest również zdefiniowany jako układ rozcieńczony, który nie wykazuje przepływu w stanie ustalonym* lub na stronie 34 *Żele są trójwymiarowymi sieciami zamykającymi w swoim rusztowaniu roztwór wodny i elementy w nim zdyspergowane*. Z drugiej strony Autorka słusznie podkreśla rolę oddziaływań białko-białko oraz białko-rozpuszczalnik w kształtowaniu właściwości żeli, czyni to jednak w sposób bardzo uproszczony i powierzchowny, w oparciu o niepełną literaturę przedmiotu. Trudno jest odnaleźć w pracy jasną definicję procesu żelowania, czytelnik dowiaduje się, że *Proces (żelowania) obejmuje szereg reakcji fizykochemicznych, takich jak dysocjacja, denaturacja, ekspozycja reszt hydrofobowych i wynikająca z tego polimeryzacja poprzez tworzenie wiązań dwusiarczkowych, hydrofobowych, wodorowych i jonowych* (strona 20) lub jak podano na stronie 32 *Żelowanie obserwuje się po denaturacji białka, gdy stężenie białka jest wyższe niż stężenie krytyczne dla żelowania, a ilość zdenaturowanego białka jest wystarczająca*. Czytelnik podczas lektury tej części pracy może odnieść wrażenie, że Autorka nie może zdecydować się czym jest żel ani na jakiej drodze powstaje, bowiem przedstawione opisy są bardzo pobieżne. W opinii recenzenta można było oprzeć się na klasycznym podejściu do fizykochemii roztworów biopolimerów, bazującym na teorii stężeń krytycznych oraz przemian konformacyjnych łańcuchów polimerowych i biopolimerowych w roztworach, opisanym np. w monografii Iwao Teraoka *Polymer solutions: An introduction to physical properties* Wiley 2002.

Przegląd literatury nie odzwierciedla niestety tematyki pracy, czyli wykorzystania pomiarów reologicznych do śledzenia procesu żelowania mikropartykułowanych białek serwatkowych. **Bardzo poważnym niedopatrzeniem Autorki jest brak w tej części pracy jakichkolwiek informacji na temat reologii, metod pomiarowych wykorzystywanych do badania właściwości układów żelowych, i w końcu stanu wiedzy z obszaru rozprawy doktorskiej.** Jedyne przedstawione dane dotyczą: *lepkości* (strona 18), a z kontekstu opisu wynika, że Autorka nie czyni rozróżnienia po-

między lepkością niutonowską a lepkością pozorną charakterystyczną dla układów nieniutonowskich. Autorka nie wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z właściwościami lepkosprężystymi ani metodami pomiarowymi służącymi do badania tych właściwości. Jest to o tyle zaskakujące, że najważniejszą część pracy doktorskiej stanowi analiza przebiegu żelowania z wykorzystaniem tych właśnie metod!

Ogólny cel pracy oraz zagadnienia szczegółowe przedstawione zostały po przeglądzie literatury. Za główny cel pracy Autorka obrała porównanie dwóch metod mikrokoagulacji generowanej ścinaniem podczas mieszania i działania wysokim ciśnieniem, jako procesów wywołujących zmiany konformacyjne białek serwatkowych. Autorka sformułowała dodatkowo dziesięć celów szczegółowych, z których tylko trzy odnoszą się do tytułu rozprawy doktorskiej, w tym jeden ma bezpośredni związek z badaniem zmian własności (a nie właściwości) reologicznych produktu podczas żelowania w celu monitorowania przebiegu procesu. W tej sytuacji czytelnik może być zaskoczony tak szerokim zakresem prac w odniesieniu do tytułu rozprawy doktorskiej, który brzmi: „Kontrola procesu żelowania mikropartykułowanych białek serwatkowych poprzez badanie właściwości reologicznych”.

Część pracy poświęcona omówieniu wyników ma zaskakujący układ, rozpoczyna je analiza rozkładu wielkości cząstek, następnie Autorka omawia jakość sensoryczną partykułowanych białek, wyniki pomiarów tekstury, elektroforegramy. Dopiero w ostatnich rozdziałach Autorka przechodzi do omówienia właściwości reologicznych mikropartykułatów. Autorka rozpoczyna dyskusję właściwości reologicznych badanych układów od ich charakterystyki podczas przepływu ścinającego i podobnie jak w przeglądzie literatury posługuje się pojęciem *lepkości* zamiast *lepkości pozornej* opisując zmiany tej wielkości w funkcji szybkości ścinania charakterystyczne dla układów rozrzedzanych ścinaniem. Omówienie właściwości lepkosprężystych następuje dopiero w kolejnym podrozdziale. Wynikom analizy procesu żelowania, czyli istocie pracy doktorskiej, Autorka poświęca zaledwie jeden rozdział zawierający się w 10 stronach! W dalszej kolejności czytelnik przechodzi do omówienia wyników uzyskanych na drodze pasywnej mikroreologii optycznej, o której Autorka nie wspomina w żaden sposób w przeglądzie literatury. Ostatni rozdział poświęcony jest mikrostrukturze mikropartykułatów białkowych, którą badano z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

W dyskusji wyników Autorka nie ustrzegła się skrótów myślowych pisząc, że *Charakterystyka wielkości cząstek wraz z takimi parametrami cząstek jak: ich kształt, gęstość oraz właściwości powierzchni stanowią podstawowe wielkości charakteryzujące cząstki czy też Analizując powyższe dane można stwierdzić, że cząstki przed procesem mikropartykulacji posiadały znaczne rozmiary, które występowały w przewodzie*. Ponadto wydaje się, że korzystniej dla czytelnika i zgodnie ze sztuką byłoby omówić w pierwszej kolejności właściwości lepkosprężyste badanych układów, włączając w to wyniki pochodzące z pasywnej mikroreologii optycznej, a następnie przejść do dyskusji nad właściwościami żeli w obszarze przepływu ścinającego. Ciekawym i naturalnym zakończeniem dyskusji właściwości me-

chanicznych mogłaby być analiza tekstury białek partykułowanych wraz z wynikami uzyskanymi na drodze skaningowej mikroskopii elektronowej.

Pomiary reologiczne wykonane w zakresie odkształceń odpowiadających liniowemu obszarowi lepkości niosą cenne informacje na temat właściwości badanych materiałów, w tym struktury i oddziaływań występujących w układach żelowych, np. w kontekście mocy badanego żelu i jego wytrzymałości na przyłożone odkształcenie. Z założenia są to badania nieniszczące ze względu na zastosowanie niewielkich deformacji (odkształceń). W tym świetle trudno zgodzić się z Autorką, która pisze na 104 stronie w następujący sposób: *Reakcja lepka i sprężysta próbki zależy od szybkości odkształceń*. W obszarze liniowej lepkości odpowiedź badanego materiału na przyłożone odkształcenie zależy od jego właściwości a nie szybkości odkształceń czyli szybkości ścinania (badania te są z założenia nieniszczące). Dalej, w tym samym akapicie Autorka pisze: *Im krótszy czas odkształcenia, czyli większa ich szybkość, tym wyraźniej ujawniają się cechy sprężyste*. To stwierdzenie sugeruje, że Autorka miała jednak na myśli częstotliwość odkształcenia przy stałej jego amplitudzie, wybranej oczywiście na podstawie testu liniowości. Oznacza to, że dane pomiarowe w postaci $G'(\omega)$ i $G''(\omega)$ tworzą widmo mechaniczne materiału, na podstawie którego możliwe jest zbudowanie ciekawej charakterystyki wytrzymałościowej badanych układów. Wykorzystanie klasycznych reometrów rotacyjnych do badania właściwości lepkościowych ograniczone jest możliwościami technicznymi, stąd w ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudzają metody mikroreologiczne. Jedną z technik pomiarowych jest pasywna mikroreologia optyczna, którą wykorzystano do badań właściwości mikropartykułowanych białek serwatkowych. Niestety i w przypadku tej techniki pomiarowej Autorka nie wprowadziła czytelnika w podstawy teoretyczne ani nie dokonała przeglądu dostępnej wiedzy. Równanie opisujące średnie kwadratowe przemieszczenie cząstki, pojawiające się po raz pierwszy na stronie 118, powinno być umieszczone w przeglądzie literatury, natomiast w rozdziale dotyczącym metodyk badawczych, Autorka powinna wyjaśnić w jaki sposób dokonała przeliczenia tej wielkości na wartości $G'(\omega)$ i $G''(\omega)$. Wydaje się, że po uporządkowaniu kolejności prezentowania wyników pomiarów możliwe byłoby spójne opisanie właściwości mikropartykułatów, które wrywkowo są prezentowane na rysunkach 25 (str. 104) i 30 (str. 116-117). Powinny one tworzyć pełny obraz zachowań lepkościowych badanych układów. Przy zastosowaniu takiej strategii analizy danych Autorka ustrzegłaby się pewnych nieścisłości, które pojawiły się w rozdziale 5.7, a które dotyczą danych prezentowanych na wykresach 30a, 30c oraz 30e (str. 116-117). Autorka prezentuje na nich zależność G' (modułu zachowawczego) od częstotliwości. W klasycznej analizie właściwości lepkościowych wartości części rzeczywistej zespolonego modułu sprężystości są proporcjonalne do stężenia/liczebności elementów sprężystych kształtujących zachowanie badanego układu. Wobec takiej interpretacji wartości G' można się spodziewać, zgodnie z uwagą Autorki podaną na stronie 104, że w zależności od zastosowanej częstotliwości odkształcenia będą ujawniać się kolejne przyczynki sprężyste kształtujące zachowanie lepkościowe. W tej sytuacji

rodzi się pytanie, w jaki sposób interpretować nietypowy przebieg G' w funkcji częstotliwości? W opinii recenzenta trudno za wyjaśnienie przyjąć stwierdzenie podane przez Autorkę na stronie 115: *Wartości modułu, które uzyskano zmieniały się chaotycznie, lecz konsekwentnie rosły ze wzrostem częstotliwości.* Na kolejnym rysunku 31 (str. 119-120) Autorka zaprezentowała wyniki pomiarów, które opisała jako: *Przebieg funkcji korelacyjnej w czasie...*, przy czym wartościom tej funkcji korelacyjnej przypisała oznaczenie $g_2(t) - 1$. W opinii recenzenta mogło dość do pewnej nieścisłości, gdyż zgodnie z przyjętymi standardami oznaczenie to jest przyporządkowane funkcji autokorelacji, która definiowana w odniesieniu do kąta i wektora rozpraszania, opisuje zjawisko zanikania oddziaływań pomiędzy molekułami. Z kolei cytowana przez Autorkę funkcja korelacji, wykorzystywana do analizy danych uzyskanych na drodze DWS, opisana jest zazwyczaj symbolem $g_1(t)$. Którą zatem funkcję miała na myśli Autorka opisując w taki sposób osie na wykresach? Jak należy rozumieć sformułowanie Autorki ze strony 118 *Im bardziej na prawo przesunięte są wartości danej krzywej, tym większe cząstki ona reprezentuje?* Czy jest to stwierdzenie dotyczące rozmiarów mikropartykułatów białek, które pozostaje w zgodności z wynikami pomiarów rozkładu wielkości cząstek (rozdział 5.1)? Czy też Autorka odnosi się do funkcji korelacji czyli równania na średnią kwadratową drogę cząstki (str. 118), co oznaczałoby, że im większa cząstka tym dłużej jest mobilna na wskutek ruchów Browna?

Ostatni rozdział pracy doktorskiej stanowią wnioski z badań. Autorka sformułowała 12 wniosków szczegółowych, które nie odnoszą się bezpośrednio do celów szczegółowych podanych na stronach 52-53 rozprawy.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera wiele ciekawych wyników pomiarów uzyskanych z zastosowaniem nowoczesnych technik pomiarowych. Realizacja programu badawczego wymagała dużego zaangażowania i nakładu pracy Autorki. W opinii recenzenta sposób przedstawienia wyników jest nieco nieuporządkowany i zawiera pewne nieścisłości, co wpływa niestety na ogólny odbiór dysertacji. W związku z przedstawionymi powyżej uwagami oraz wyraźnym brakiem przeglądu literatury w kierunku wykorzystania reologii recenzent bardzo prosi o dodatkowe ustosunkowanie się Autorki do następujących kwestii:

- jakie metody pomiarowe z obszaru reologii można stosować do badania żeli i produktów bazujących na żelach,
- jaki jest stan wiedzy na temat wykorzystania metod reologicznych do badania właściwości żeli bazujących na białkach serwatkowych,
- jakie problemy można napotkać podczas śledzenia procesu żelowania za pomocą metod reologicznych,
- jakie techniki pomiarowe stosuje się w ramach mikroreologii i jakie są ich ograniczenia,

- jaki jest związek pomiędzy wynikami uzyskanymi na drodze klasycznych pomiarów w obszarze liniowej lepkości a wynikami otrzymanymi z wykorzystaniem mikroreologii.

Wniosek końcowy: działając zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Doroty Krzykowskiej spełnia kryteria stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora i **wnioskuje do Rady Naukowej Dyscypliny technologia żywności i żywienia Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie Pani mgr inż. Doroty Krzykowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



dr hab. inż. Anna Ptaszek, prof. UR