

Poznań, 29.08.2016

Prof. dr hab. Katarzyna Czaczyk  
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wojska Polskiego 48  
60-637 Poznań

## RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr inż. Macieja Grabowskiego**  
**pt. „Zastosowanie technologii plazmy nietermicznej do sterylizacji przypraw”**  
wykonanej w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej,  
na Wydziale Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu  
Technologicznego w Szczecinie  
**pod kierunkiem prof. dr hab. Waldemara Dąbrowskiego**  
**i dr hab. inż. Marcina Holuba**

### Dobór i znaczenie tematu

PRZYPRAWY to składnik żywności bez którego nikt z nas, w dzisiejszych czasach, nie wyobraża sobie gotowania i spożywania potraw. Zioła i przyprawy królują w naszych kuchniach i na naszych stołach – krajowe i importowane, łagodne i pikantne, pełne aromatów śródziemnomorskich czy korzennych. Zawierają ważne dla zdrowia i samopoczucia człowieka substancje, takie jak witaminy czy antyoksydanty, mają działanie przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne. Pobudzają także proces trawienia, a niektóre z nich działają konserwująco na żywność.

Jednakże przeciętny Konsument nie zdaje sobie sprawy z tego, że te składniki żywności, używane w niewielkich ilościach dla poprawienia walorów smakowo-zapachowych żywności, mogą stanowić zagrożenie dla Jego zdrowia czy życia. Skażenie mikrobiologiczne przypraw jest problemem z którym nauka boryka się już od wielu lat. Powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym przyprawy mogą stanowić (i jak wynika z danych literaturowych bardzo często stanowią) źródło mikroorganizmów powodujących psucie się żywności lub/i mikroorganizmów chorobotwórczych. W konsekwencji może to doprowadzić do zanieczyszczenia produktów lub potraw wytworzonych z ich udziałem.

Tradycyjne metody dekontaminacji przypraw opierają się głównie na metodach termicznych, które z jednej strony zapewniają wysoką skuteczność pod względem

mikrobiologicznym, a z drugiej strony wpływają na obniżenie ich aromatu, zmiany smaku i barwy czy zmniejszenie zawartości związków biologicznie czynnych. Metody niekonwencjonalne, obejmujące m.in. stosowanie wysokich ciśnień, ditlenku węgla pod zwiększonym ciśnieniem, mikrofal, promieniowania jonizującego i promieniowania podczerwonego czy stosowanie substancji chemicznych takich jak tlenek etylenu, bromek metylu, formaldehyd czy ozon, wykazują tylko częściową skuteczność w redukcji liczby drobnoustrojów i przyczyniają się do utraty związków biologicznie aktywnych. Nadal poszukiwane są alternatywne metody, analizuje się m.in. wykorzystanie technologii plazmowych do sterylizacji żywności. W tym kontekście podjęta przez Doktoranta tematyka badawcza jest bardzo aktualna i ciekawa, w szczególności pod względem aplikacyjnym. Ponadto znikoma liczba publikacji w tym zakresie świadczy o tym, że badania te można uznać za nowatorskie.

#### Ocena formalnej strony pracy

Praca doktorska mgr inż. Macieja Grabowskiego jest opracowaniem obejmującym 154 strony maszynopisu, w tym 94 ryciny oraz 25 tabel. Struktura pracy jest właściwa dla rozpraw o charakterze eksperymentalnym i zawiera komplet rozdziałów obejmujących wstęp, cel pracy, charakterystykę materiału i metod badawczych, opis wyników badań i dyskusję, wnioski, bibliografię, spis rysunków i tabel oraz aneks. Brak jest w pracy typowego rozdziału pt. „Przegląd piśmiennictwa”, ale informacje dotyczące literatury przedmiotu Autor zawarł we wstępie. W pracy zacytowano 131 pozycji światowego piśmiennictwa, związanego z tematyką przedstawionego opracowania oraz 6 stron internetowych. W zdecydowanej większości jest to literatura angielskojęzyczna obejmująca najnowsze badania związane z zagadnieniami poruszonymi w niniejszym opracowaniu. Cytowania pozycji bibliograficznych, jak i własnych dokumentów w tekście są prawidłowe. Geneza i cel pracy są jasno i precyzyjnie sformułowane, a tytuł pracy dobrze odzwierciedla zakres przeprowadzonych badań.

#### Ocena merytoryczna pracy

Jak wspomniano wcześniej, w pracy brak typowego rozdziału pt. „Przegląd piśmiennictwa”, ale informacje dotyczące tych zagadnień Autor zawarł we wstępie w dwóch podrozdziałach: „Tradycyjne metody dekontaminacji mikrobiologicznej przypraw” i „Niekonwencjonalne metody dekontaminacji mikrobiologicznej żywności”. Pierwszy z tych podrozdziałów, poświęcony wykorzystaniu metod tradycyjnych, jest bardzo krótkim opracowaniem, wręcz szcątkowym, w którym opisano tylko kilka technologii sterylizacji

przypraw opartych na wykorzystaniu wysokich temperatur. W tym wypadku literatura przedmiotu pozwoliłaby na znacznie szersze omówienie tematu. Szczególnie interesujące, z punktu widzenia opracowania nowej technologii, mogłoby być opisanie niekorzystnych zmian właściwości organoleptycznych przypraw, jakie zachodzą po zastosowaniu metod termicznych. Autor ograniczył się tutaj do jednego zdania – że takie, niekorzystne zmiany zachodzą. Wśród metod opisanych w tym rozdziale jest wykorzystanie fal mikrofalowych do sterylizacji przypraw (patent Bajorek i Bajorek, 2011), którą to metodę w drugim rozdziale Autor zalicza do niekonwencjonalnych...

Drugi podrozdział Wstępu, zatytułowany „Niekonwencjonalne metody dekontaminacji mikrobiologicznej żywności” w zasadzie w całości poświęcony jest działaniu zimnej plazmy. Inne niekonwencjonalne metody dekontaminacji mikrobiologicznej żywności zostały tylko wymienione. W tym kontekście tytuł tego podrozdziału nie odpowiada jego treści. Zawarte w tym rozdziale informacje dotyczące niskotemperaturowej plazmy są niewątpliwie bardzo interesujące i świadczą o dobrej znajomości zagadnień przez Doktoranta, jednakże zostały przedstawione w sposób dość chaotyczny. Tematyka związana z istotą zjawiska generowania zimnej plazmy miesza się z potencjalnymi jej zastosowaniami, zarówno w technologii żywności jak i w innych dziedzinach gospodarki. Na końcu tego podrozdziału zamieszczono np. tabelę ilustrującą podział i charakterystykę urządzeń generujących plazmę, co zdaniem Recenzenta powinno znaleźć się we wcześniejszych fragmentach tego rozdziału.

Jednakże pomimo pewnych zastrzeżeń uważam, że przedstawione opracowanie literaturowe jest dobrym wprowadzeniem do części eksperymentalnej tej rozprawy dyplomowej.

W rozdziale 3 i 4 (odpowiednio Materiał i Metody) Pan Maciej Grabowski przedstawił stosowane materiały i metody badań. Na podkreślenie zasługuje w szczególności bardzo dobry dobór materiału modelowego – pieprzu czarnego i papryki słodkiej. Przyprawy te są jednymi z najczęściej stosowanych, a ponadto są importowane, a więc istnieje potencjalne ryzyko występowania drobnoustrojów z innych stref klimatycznych, które dla nas mogą stanowić zagrożenie zdrowotne.

Doktorant posługiwał się technikami i metodami adekwatnymi do potrzeb wynikających z celu pracy. Ogólnie można stwierdzić, że metodyka badań, stosowana przez Autora gwarantuje dobrą analitykę założonych badań. Rozdział ten został przygotowany starannie, a wszystkie doświadczenia i urządzenia szczegółowo opisane. Analizując tą część

pracy Recenzentowi nasunęło się pytanie dotyczące obliczania liczby drobnoustrojów po przeprowadzonym procesie plazmowania – dlaczego Autor zdecydował się na zastąpienie wzorów na obliczanie liczby drobnoustrojów z normy PN-EN ISO 7218:2008 przez wzór Farmiloe?

W pracy, do sterylizacji przypraw, wykorzystano dziewięć wariantów warunków i reaktorów generujących plazmę zarówno w próżni jak i w warunkach ciśnienia atmosferycznego. Zestawienie wykonanych doświadczeń przedstawiono w tabeli 5. Jednakże tytuły poszczególnych kolumn tej tabeli wymagały by pewnego uszczegółowienia. Badanie jakich wyróżników obejmowała np. „Ogólna ocena organoleptyczna” (kolumna 3) i czym się różniła od „Badań sensorycznych” (kolumna 5)? Jakie wyróżniki były oceniane przy „Badaniu składników przypraw” (kolumna 6)? Dla których prób wykonano pomiar barwy czy badanie aktywności wody? Ponadto tabela 5 nie powinna mieć tytułu „Podsumowanie wyników badań”, gdyż takich wyników nie zawiera.

Pierwszy rozdział omówienia wyników to wg tytułu - badanie wpływu obróbki cieplnej w suchym gorącym powietrzu na własności przypraw. W rzeczywistości opisano tutaj tylko wizualne zmiany barwy pieprzu czarnego pod wpływem temperatury. Nasuwają się pytania: dlaczego nie wykonano takich badań dla papryki i dlaczego nie wykorzystano tu metody pomiaru barwy opisanej w punkcie 4.5.4 metodyki (lub tego nie opisano)? W tym kontekście zdziwienie budzi tak dokładne ustalenie granicznej wartości temperatury przy której pieprz zaczyna zmieniać swoją barwę (68,3°C).

W kolejnych rozdziałach Autor opisał wyniki badań dla dziewięciu rodzajów warunków i reaktorów generujących plazmę do sterylizacji badanych próbek przypraw. Jest to studium wpływu różnych zjawisk fizycznych związanych z generowaniem plazmy nietermicznej na barwę, zapach, ubytek masy i stan mikrobiologiczny papryki i pieprzu. Badania zaplanowano w logiczny sposób i w przypadkach gdzie ocena organoleptyczna dyskwalifikowała produkt, dalszych analiz nie prowadzono. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobrze zilustrowanie, w postaci fotografii, zmian jakie zachodziły w przyprawach podczas procesu plazmowania.

W pierwszym z reaktorów (reaktor firmy Diener Electronics) wykorzystano zimną plazmę niskociśnieniową przy zastosowaniu różnych gazów (tlen, azot, argon powietrze), w wariantach rotacyjnym i stacjonarnym ciągłym. Ze względu na istotne zmiany barwy papryki w tym procesie, dalsze badania kontynuowano tylko dla pieprzu. Jednakże ze względu na ubytek masy, który w zależności od wariantów doświadczeń wahał się w granicach 6-10%,

długi czas plazmowania, jak również zbyt niską redukcję liczebności badanych grup mikroorganizmów, dalszych badań przy użyciu plazmy niskociśnieniowej wytwarzanej w urządzeniu firmy Diener Electronics nie kontynuowano. Również badania przy użyciu reaktora firmy Johnson & Johnson wykazały znaczącą utratę zapachu pieprzu i zbyt małą redukcję liczebności badanych grup mikroorganizmów i nie były one kontynuowane.

W kolejnych etapach doświadczeń do badań wykorzystano reaktory wykorzystujące wyładowania SDBD (reaktor typu PCB i reaktor wykonany z tlenku glinu). W tych wariantach doświadczeń uzyskano widoczne zmiany organoleptyczne produktu i w związku z tym dalszych analiz nie wykonywano. Jednakże na uwagę zasługuje tutaj wnikliwa analiza Autora warunków panujących w tych reaktorach i ich potencjalnego wpływu na zamiany cech organoleptycznych pieprzu czarnego.

Dalsze etapy pracy to próby wykorzystania wyładowań DBD – wyładowania dielektryczne barierowe (minireaktor 1 i 2) do sterylizacji przypraw. Tylko w przypadku minireaktora 2 uzyskano pozytywne wyniki analiz sensorycznych i dla tego wariantu przeprowadzono analizy mikrobiologiczne. Uzyskano tutaj redukcję liczby mikroorganizmów na poziomie 1-3 logarytmów w zależności od zastosowanego gazu (powietrze, argon). Zastosowanie wyładowań koronowych (reaktor pięcioigłowy) nie spowodowało zmian barwy pieprzu czarnego, a jedynie nieznaczne obniżenie intensywności zapachu. Badań nie kontynuowano ze względu na awarię zasilacza. Dopiero wykorzystanie reaktora wieloigłowego, który umożliwił generowanie wyładowań dielektrycznych barierowych lub wyładowań koronowych do sterylizacji pieprzu i papryki dało satysfakcjonujące wyniki. Dla tego wariantu doświadczeń wykonano komplet analiz, który umożliwił wykazanie przydatności tej techniki do wyjaławiania przypraw. Zarówno zastosowanie wyładowań koronowych w atmosferze powietrza czy argonu, jak i wyładowań dielektrycznych barierowych w atmosferze powietrza czy argonu, nie powodowało istotnych zmian cech organoleptycznych, masy oraz aktywności wody badanych przypraw. Dla tego wariantu przeprowadzono również kompleksową analizę mikrobiologiczną, która wykazała bakteriobójczy efekt plazmy generowanej w tym reaktorze. Na tym etapie pracy nasuwa się pytanie – czy zdaniem Autora taka redukcja liczby mikroorganizmów jest satysfakcjonująca? Bardzo ciekawe są wyniki redukcji liczby mikroorganizmów w papryce słodkiej do poziomu poniżej limitu ich wykrywalności po 5 minutowym plazmowaniu (a dla wariantu wyładowań DBD w atmosferze argonu po 8 minutowym plazmowaniu), a następnie wzrost ich liczebności przy dalszym wydłużaniu czasu procesu. W dyskusji wyników Autor stara się wytłumaczyć to

dziwne zjawisko, wskazuje na jego nieprzypadkowość (wykonanie 10 powtórzeń), jak również przytacza podobne efekty z literatury przedmiotu. Nie mniej jednak taki efekt mikrobiologiczny wskazuje na to, że działanie bakteriobójcze plazmy nietermicznej jest procesem skomplikowanym i wymaga dalszych, pogłębionych badań. Dalsze badania obejmujące określenie barwy przypraw (nasylenie barwy, zmiany współczynnika czerwoności do żółtości i współczynnika jasności) nie wykazały znaczących zmian tych parametrów. Nie stwierdzono istotnych zmian zawartości piperyny w pieprzu i kapsaicyny w papryce, składników odpowiedzialnych za smak tych przypraw, jak również całkowitej zawartości olejków eterycznych, odpowiedzialnych za zapach przypraw. Wszystko to wskazuje, że w tym wariacie doświadczeń, nie zaobserwowano istotnych zmian organoleptycznych produktów.

Zwieńczeniem tej pracy jest projekt zautomatyzowanego laboratoryjnego generatora wieloigłowego umożliwiającego wzbudzanie wyładowań koronowych i wyładowań dielektrycznych barierowych, naprzemiennie. Urządzenie wyposażone zostało m.in. w system równomiernego rozpraszania gazu w komorze oraz lepszego jej chłodzenia, czujniki wilgotności, temperatury i ciśnienia. Ponieważ zagadnienie powstawania różnych związków w trakcie generowania plazmy z różnych gazów nie jest do końca poznane, takie wyposażenie gwarantuje stabilność aparatu i dobre możliwości kontroli procesu. Zdaniem Recenzenta przygotowanie projektu takiego urządzenia jest dużym osiągnięciem Doktoranta i umożliwia kontynuowanie badań nad zastosowaniem technologii plazmy nietermicznej do sterylizacji nie tylko przypraw, ale również innych rodzajów żywności.

Ostatni rozdział opisu wyników to analiza opakowań, w której zawarto cenne informacje dotyczące barierowości stosowanych opakowań oraz możliwości i warunków ich stosowania w procesach wykorzystujących zimną plazmę. Jednakże zdaniem Recenzenta rozdział ten powinien być zamieszczony raczej na początku opisu wyników, a nie na końcu.

Uzyskane rezultaty Pan mgr inż. Maciej Grabowski poddał wnikliwej ocenie w odniesieniu do dostępnej literatury (21 stron dyskusji). Dyskusja wyników badań z punktu merytorycznego jest prowadzona w sposób logiczny i rzeczowy. Doktorant nawiązuje do nielicznych wyników badań innych autorów prowadzących takie badania. Podsumowaniem pracy jest 10 wniosków, które znajdują uzasadnienie w wynikach prac eksperymentalnych.

Inne uwagi:

- W wielu miejscach w pracy Autor używa określenia „ilość drobnoustrojów”. Powinno być liczba drobnoustrojów

- W tabeli 6 i na rycinie 31 przedstawiono identyczne wyniki. Jaki był cel tego dublowania wyników?
- W aneksie, w tabelach 1.A, 2.A i 3.A przedstawiono szczegółowe wyniki analiz mikrobiologicznych. Zastrzeżenia Recenzenta budzą puste pola w tych tabelach, które mogą oznaczać zarówno brak wzrostu, jak i wzrost poniżej limitu detekcji, wzrost powyżej 300 kolonii na płycie czy niewykonanie posiewu. Wprowadzenie oznaczeń dla tych wariantów wyników pozwoliłoby zaobserwować pewne rozbieżności wyników czy tendencje. W jaki sposób limit detekcji mikroorganizmów w tych posiewach został ustalony na poziomie  $4 \times 10^0$  jtk/g ?

Przedłożoną mi do recenzji pracę przeczytałam z dużym zainteresowaniem. W trakcie czytania wyłoniły się pewne uwagi o charakterze dyskusyjnym. Postawione przeze mnie pytania i wątpliwości mają na celu wywołanie dyskusji z Autorem, która przyczyniłaby się do lepszej interpretacji uzyskanych rezultatów i nie mają one istotnego wpływu na ocenę końcową tej rozprawy dysertacyjnej.

#### Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską mgr inż. Macieja Grabowskiego oceniam wysoko. Jest to poprawnie zaplanowane i dobrze wykonane studium naukowe. Świadczy to o dojrzałości Autora i Jego dobrym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym. W pracy zamieszczono bogaty materiał faktograficzny, a wyniki badań noszą znamiona oryginalności. Biorąc pod uwagę wartość pracy, szeroki zakres problematyki badawczej, prawidłowo przeprowadzone eksperymenty badawcze z użyciem właściwych technik analitycznych, sposób interpretacji uzyskanych wyników oraz umiejętność logicznego wnioskowania stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa Pana Macieja Grabowskiego w pełni odpowiada wymaganiom ustawowym, w myśl rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. W związku z tym wnoszę o jej przyjęcie przez Radę Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, oraz o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora.



Katarzyna Czaczyk