



Opole 30 sierpnia 2016

dr hab. Jacek Lipok, prof. UO

### OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Jawień,  
pt.: „Zastosowanie spektroskopii NMR w analizie metabolomicznej  
produktów spożywczych i płodów rolnych”,  
wykonanej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej  
Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej,  
pod kierunkiem dr hab. Piotra Młynarza, prof. PWr

Coraz bardziej zaawansowane możliwości kojarzenia metod instrumentalnych analizy chemicznej, szczególnie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego oraz spektrometrii mas, z zaawansowanymi metodami obliczeniowymi sprawiły, że od ponad dekady, metabolomika stała się jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się, interdyscyplinarnych dziedzin badawczych. Sposobność oceny zmian składu metabolomu komórek, tkanek a nawet całych narządów, stwarza zupełnie nowe możliwości badania procesów chemicznych nieodłącznie związanych z funkcjonowaniem żywych organizmów. Wszechstronność tego rozwiązania odzwierciedla rosnąca liczba publikacji „metabolomicznych” poświęconych zagadnieniom medycznym, środowiskowym, czy też tym związanym z produkcją rolniczą. W nurcie badań dotyczących produkcji i przetwarzania żywności, znakomicie mieszczą się dociekania zawarte w dysertacji Pani mgr inż. Ewy Jawień, o czym Autorka informuje słowami: „... głównym założeniem jest wykorzystanie narzędzi metabolomicznych w badaniach żywności i płodów rolnych”. Tezę tę potwierdzają cztery wymienione cele badawcze, z których każdy stanowi odrębną merytoryczną ideę.

Przedstawiona do oceny praca ma zwartą formę monografii liczącej sto czterdzieści dwie (142) strony maszynopisu. Część merytoryczną tego opracowania otwiera przedstawienie celu pracy poprzedzające streszczenie w j. polskim i w j. angielskim. Następnym działem jest część literaturowa, poprzedzająca część doświadczalną zawierającą



omówienie metodyki prac badawczych Autorki, a także omówienie rezultatów badań, ich dyskusję i wnioski dotyczące każdego z wyodrębnionych celów badawczych. Część doświadczalną zamyka podsumowanie i wnioski ogólne, po których zamieszczone zostały informacje odnośnie dorobku naukowego Doktorantki oraz wykaz cytowanego piśmiennictwa. Warto zaznaczyć, iż część doświadczalna dysertacji obejmuje połowę jej objętości, co dobrze koreluje z wyraźnie eksperymentalnym charakterem toku badań prowadzonych przez Autorkę.

Część literaturowa pracy zawiera (zgodnie z zapowiedzią Autorki) wiele różnorodnych i interesujących wątków; począwszy od podstawowych definicji zagadnień poruszanych w pracy, poprzez zarys metodologii tego typu badań, w którym sygnalizowane są kwestie zarówno badań aparaturowych z wykorzystaniem spektroskopii NMR, jak i elementy statystyki i chemometrii. W tej samej części Doktorantka umieściła również nieco bardziej precyzyjne omówienie kwestii metodologicznych, odniesione do Jej toku badań. Taki układ części literaturowej umożliwia stworzenie w miarę pełnego obrazu problematyki badawczej oraz podjętych przez Autorkę działań. Jednak sposób przekazu informacji w poszczególnych omawianych wątkach nie ułatwia czytelnikowi tego zadania. Trudno orzec czy to kwestia użycia tzw. skrótów myślowych, czy raczej hermetycznego języka, którym często posługują się badacze zajmujący się określoną dziedziną wiedzy. Stwierdzenie w rodzaju: „Oba komponenty nie wyjaśniają przeważnie całej zmienności, pozostała część jest tworzona przez dalsze komponenty, które mają coraz mniejszy wkład do modelu.” (str.44) wydaje się spełniać kryteria obu wspomnianych form.

Podobne zastrzeżenia budzą występujące w tekście dysertacji nadmierne uproszczenia językowe. Niejednoznaczność takich sformułowań utrudnia zaakceptowanie proponowanej przez Autorkę wersji przekazu. Przykładami mogą być stwierdzenia (str. 58): „Właściwości żyworódki pierzastej mogą stanowić alternatywę dla stosowanych dotychczas antybiotyków i stanowić cenne źródło składników bioaktywnych.”, czy „Szerokie spektrum działania tej rośliny wpływa również na zdrowie kur i może przyczynić się do zmian ich metabolizmu.”, albo (str.61)...tak ważny jest rozwój nauk takich jak proteomika czy metabolomika, które umożliwiają zrozumienia regulacji komórkowych.”. Ostatnie z wymienionych, stwierdzenie, które w zamysle Doktorantki miało (i słusznie) podkreślać rangę reprezentowanej przez Nią dziedziny badań, staje się powodem konfuzji, jako że użyty polski termin „regulacje komórkowe” niekoniecznie odnosi się do regulacji procesów biochemicznych (cykli, szlaków metabolicznych, reakcji sprzężonych) zachodzących w komórkach żywych organizmów.



Pewne kontrowersje budzą także stosowane przez Autorkę uproszczenia merytoryczne, wynikające z zastosowania pojęć rodem z żargonu fachowego np.: „Liofilizację stosuje się w celu uzyskania zateżenia płynu.”, „... zmniejszenie na widmie  $^1\text{H}$  NMR rezonansu pochodzącego od cząsteczek wody.” (str.31), czy „Zaawansowana analiza wielowymiarowa oraz analiza statystyczna pozwalają na uzyskanie istotnych metabolitów ...” (str.53). Zapoznając się z dorobkiem Doktorantki, nie mam wątpliwości, że właściwie rozumie pojęcie „pierwiastki śladowe”, niemniej jednak wielokrotne nadużywanie tego określenia w zestawieniu z „metalami ciężkimi” (str. 58-61), aż po stwierdzenie „Zanieczyszczenie środowiska jonami metali ciężkich i pierwiastków śladowych stanowi jedno z głównych zagrożeń dla zdrowia człowieka.”, staje się irytujące. Mniejsze znaczenie, w tej sytuacji, ma twórcze rozwinięcie nośnego medialnie hasła, bardziej istotna jest kwestia czy pierwiastki śladowe mogą stanowić jakiegokolwiek zagrożenie, dopóki występują w stężeniach uzasadniających użycie terminu „śladowe”.

Domeną merytoryczną omawianej dysertacji są szeroko pojęte probabilistyka i statystyka, zaimplementowane do weryfikacji zjawisk chemicznych zachodzących w komórkach i tkankach żywych organizmów. Ponieważ funkcjonowanie nawet najmniej złożonych strukturalnie, jednokomórkowych organizmów tylko w pewnym przybliżeniu poddaje się opisowi matematycznemu, precyzja sformułowań i klarowność stosowanych terminów stają się wymogiem, już na wstępie tego typu rozważań.

Mankamenty, które stały się powodem sformułowania powyższych uwag, występują najczęściej w omówieniu stanu wiedzy, co jest o tyle intrygujące, że w tej samej części pracy znajdują się także bardzo dobrze skomponowane i opisane wątki, jak np. zasady wstępnego przetwarzania danych uzyskanych w wyniku pomiarów NMR. W kontekście kompozycji omawianej części literaturowej, intrygujący jest tytuł rozdziału III: „Badania własne” (str.55), którego kolejne trzy podrozdziały zawierają informacje pozyskane z przeglądu piśmiennictwa, związanego z zadaniami badawczymi, których rezultaty stały się przedmiotem niniejszej dysertacji. Tytuł ten wskazuje bowiem, że w treści rozdziału powinny znajdować się informacje pozyskane w toku własnych badań Autorki.

Kończąc ocenę części literaturowej, chciałbym stwierdzić, że nie zamierzam odnosić się do drobnych błędów redakcyjnych (literówki, interpunkcja, brak końcówek wyrazów, niepoprawne formy gramatyczne), które incydentalnie znajdują się w tym opracowaniu, ponieważ nie znam ani jednej rozprawy doktorskiej pozbawionej tego typu mankamentów. Namawiam jednak gorąco Autorkę, by w kolejnych publikacjach (szczególnie tych „w przygotowaniu”) nie zapomniała o opisach osi wykresów. Taka informacja naprawdę znakomicie ułatwia interpretację przedstawionych tam danych.



Zgodnie z klarownie sformułowanymi, interesującymi celami szczegółowymi, meritum części doświadczalnej rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Jawień, powinny stanowić cztery wewnętrznie spójne historie, połączone wspólnym wątkiem – profilowaniem metabolomicznym z wykorzystaniem spektroskopii NMR oraz analiz chemometrycznych i statystycznych. Tymczasem już na etapie opisu sposobów przygotowaniu próbek, Autorka skutecznie zmienia tok narracji, zapoznając czytelnika najpierw z procedurami badawczymi wszystkich czterech projektów, dopiero potem dzieli się kolejno ich wynikami. Dyskusja wyników przedstawiona jest w następnym rozdziale, odrębnie w odniesieniu do poszczególnych projektów. Zdaniem recenzenta, taka kompozycja utrudnia rozpoznanie i docenienie walorów, czterech odrębnych, interesujących i unikalnych wątków badań naukowych. By przekonać się, iż tak jest w istocie, wystarczy ponownie przeczytać tę część dysertacji, tym razem jednak wędrując tropem określonego wątku (celu) badań. Ten prosty zabieg pozwala w pełni docenić koncepcję poszczególnych projektów i rzeczywiste osiągnięcia naukowe związane z ich realizacją.

Osiągnięcia te, w przypadku dwóch projektów (jakość nasion maku i wpływ rodzaju paszy na skład chemiczny jaj kurzych), zostały już usankcjonowane współautorskimi publikacjami Doktorantki w czasopismach z listy A MNiSW.

Niemniej jednak pojawiają się niejasności związane z informacjami podanymi w dysertacji, a dotyczącymi przygotowania próbek maku do analizy procesu parzenia. Analiza wykresu znajdującego się na rys. 23 wskazuje, że zbyt długie parzenie zachodzi wtedy kiedy wydłuża się czas tego procesu, a równocześnie rośnie (lub utrzymuje się wysoka) temperatura parzenia. Tymczasem Autorka wyjaśnia, iż: „Zbyt długo parzone próbki nasion maku otrzymano poprzez przeprowadzanie procesu parzenia po raz drugi.” Czy zatem próbki maku parzone dwukrotnie, ale poprawnie, odpowiadają tym, które określa się jako „zbyt długo parzone” w warunkach technologicznych?

Wracając do kwestii terminologii, przy okazji wątku badań: „Metabolomiczna analiza wpływu zawartości jonów metali ciężkich i pierwiastków śladowych na skład zbóż”, chciałbym zwrócić uwagę na fakt, iż wspomniane zboża z pewnością korzeniły się w glebie (nie w ziemi) i w tej też matrycy (w glebie) przeprowadzono oznaczenia zawartości jonów metali. Niepoprawne użycie terminu (Ziemia) zwraca uwagę szczególnie w tabeli 4 (str.67), gdzie w nagłówku drugiej kolumny pojawia się nazwa naszej planety ...

Intrygujące, z punktu widzenia analityki chemicznej, są podane masy naważek próbek: nasion maku (str. 70), która wynosiła  $0,05 \pm 7,32 \cdot 10^{-5}$  g, czyli  $50\ 000 \pm 73,2$   $\mu$ g oraz mąki z ziaren zbóż (str. 71) wynoszących  $1,0$  g  $\pm$   $0,0048$  g, czyli  $1000 \pm 4,8$  mg. W obu przypadkach istotna staje się kwestia cyfr znaczących, natomiast w przypadku próbek maku także techniczna możliwość odczytania wartości  $0,2$   $\mu$ g, gdyż w wykazie aparatury nie podano mikrowagi analitycznej.



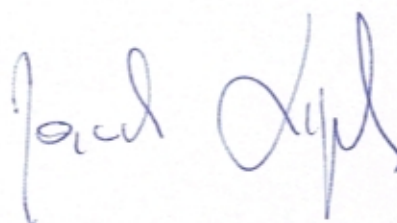
Zastanawia również informacja podana przez Autorkę na str. 91, w toku omówienia wpływu różnej karmy na skład chemiczny jaj kurzych: "Niskie wartości  $R^2$  i  $Q^2$  świadczą o tym, że białko i żółtko nie posiadają potencjału predykcyjnego (Tab. 10).", gdyż we wspomnianej tabeli, mieszczącej się na tej samej stronie, w ogóle nie podano wartości  $Q^2$ .

Odnosząc się dalej do wyników prezentowanych przez Autorkę to przyznam, że nie byłem w stanie zidentyfikować tych, które Doktorantka określa w podsumowaniu (str. 122), jako „Przypinanie odpowiedniego profilu metabolicznego dla maku nieparzonego ...”. Co do wyników badań związanych ze składem chemicznym jaj kurzych, myślę, że wprowadzenie do zestawu próbek pasz zawierających dodatki modyfikujące ich skład, mogłoby przysłużyć się pełniejszej dyskusji obserwowanych zmian. Natomiast w kwestii składu chemicznego nasion zbóż, unikałbym bezpośredniej korelacji obserwowanych zmian z procesami biochemicznymi zachodzącymi głównie w innych organach roślin. Z tego też powodu stwierdzenie sformułowane przez Autorkę jako osiągnięcie str. 123: „Opracowanie wpływu jonów metali ciężkich na szlaki metaboliczne glutaminy, asparagianu, alaniny, BCAA, jak również cyklu kwasu cytrynowego.”, uważam za nieuzasadnione.

Koncentrując się na bezspornych walorach ocenianej rozprawy, chciałbym stwierdzić, że niezależnie od sformułowanych wyżej uwag, które wynikają z pełnionej przeze mnie roli recenzenta, opracowanie to dostarcza kolejnych, przekonujących argumentów na rzecz zastosowania metod profilowania metabolomicznego z wykorzystaniem spektroskopii NMR, wraz z analizą chemometryczną i statystyczną, w wieloaspektowej analizie żywności. Mimo wspomnianej także przez Doktorantkę fragmentaryczności relacjonowanych badań, możliwość zastosowania procedury badawczej, której kanon sprawdza się znakomicie w ocenie składu tak różnych matryc jak nasiona roślin i jaja kurze, jest niewątpliwie interesującą perspektywą aplikacyjną. Świadczą o tym konkretne osiągnięcia Doktorantki, do których można zaliczyć:

- uzyskanie profili metabolicznych wszystkich analizowanych pod tym kątem matryc,
- identyfikację głównych markerów różnicujących matryce roślinne (nasiona maku i nasiona zbóż) w zależności od działających czynników abiotycznych,
- potwierdzenie „pokrewieństwa” żyta, pszenżyta i pszenicy, metodą profilowania metabolomicznego,
- wykazanie zależności pomiędzy odpowiednią zawartością jonów wybranych metali przejściowych w glebie, a składem chemicznym nasion zbóż uprawianych na tych glebach,
- potwierdzenie ograniczenia transportu niektórych składników chemicznych pasz do białka i żółtka jaj kurzych.

Podsumowując ocenę dysertacji doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Jawień, mogę stwierdzić, iż praca ta zawiera oryginalny i aktualny tematycznie opis dociekań Autorki, poświęconych zagadnieniom naukowym o znaczącym potencjale aplikacyjnym i w moim przekonaniu spełnia warunki ujęte w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. z późniejszymi zmianami. Wnoszę zatem o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej Pani mgr. inż. Ewy Jawień do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Paul Kipl". The signature is written in a cursive, flowing style.