



UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI
KATEDRA TECHNOLOGII SUROWCÓW ZWIERZĘCYCH I ZARZĄDZANIA JAKOŚCIĄ

Prof. dr hab. Tadeusz Trziszka
Wydział Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

Pracy doktorskiej pt.: „Zastosowanie spektroskopii NMR w analizie metabolicznej produktów spożywczych i płodów rolnych”

Autor: mgr inż. Ewa Jawień

Promotor: dr hab. Piotr Młynarz, prof. PWr

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemii Politechniki Wrocławskiej

1. Wartość podjętej tematyki w świetle aktualnych trendów

Ogromny postęp w technologii żywności w ostatnich kilkunastu latach przyczynił się istotnie do wprowadzania na rynek nowych kategorii żywności i zróżnicowanych asortymentów, w tym m.in. żywność funkcjonalna, suplementy diety, nutraceutyki, bio- i ekopreparaty itp. Jednocześnie od 2004 roku zostały zastrzeżone wymagania co do bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i rozwinięto nowe standardy obowiązujące w łańcuchu produkcji wyrobów spożywczych, zwłaszcza zgodnie z europejskim prawem żywnościowym wprowadzając zasady traceability, czyli identyfikacji i identyfikowalności. Obowiązujące regulacje prawne w zakresie produkcji surowców rolnych i ich przetwórstwa kierują szczególną uwagę na jakość i bezpieczeństwo żywności jako produktu finalnego z uwzględnieniem całego łańcucha produkcyjnego. W tej sytuacji nowoczesne metody analityczne o dużej sprawności i wydajności stają się kluczowym czynnikiem w systemach wytwórczych żywności. Rośnie popularność na żywność wygodną i zapotrzebowanie na liczne produkty pozwalające na szybkie przygotowanie potraw, przy zachowaniu wysokiej trwałości pod względem mikrobiologicznym i w ochronie przed procesami oksydacji. Polska jako państwo członkowskie UE musi przestrzegać odpowiednich uregulowań prawnych Wspólnoty, w tym prawa żywnościowego zawartego w rozporządzeniu 178/2002 oraz w tzw. pakiecie higienicznym rozporządzeń 852, 853, 854, 882, a także respektować strategię bezpieczeństwa żywnościowego nakreśloną przez EFSA. Bezpieczeństwo żywności jest zasadniczym obowiązkiem jaki musi zagwarantować konsumentom współczesny przemysł przetwórczy i stosowane tam technologie. Konieczność zapewnienia jakości, w tym wysokich standardów higieny żywności oraz wysoki poziom konkurencji na rynku żywności zmusza do prowadzenia nieustannych prac badawczych i wdrażania innowacyjnych technologii na rzecz bezpieczeństwa konsumenta. Dlatego też w perspektywie jakości i bezpieczeństwa żywności kluczowym elementem są metody badań z uwzględnieniem najnowszych osiągnięć naukowych. Wśród najnowszych obszarów analitycznych wiodące miejsce zajmuje biologia systemowa, a zwłaszcza genomika, transkryptomika, proteomika, metabolomika i ostatnio foodomika łącząca wszystkie powyższe obszary analityczne. Foodomika staje się kluczowym obszarem wiedzy o żywności w aspekcie analitycznym wiążącym wymagania w zakresie bezpieczeństwa, jakości i identyfikacji żywności. Dzięki foodomice możemy identyfikować żywność, określać zafałszowania i zrządzać procesami produkcji żywności oraz monitorować cały łańcuch produkcji żywności i jej dystrybucji od „pola do stołu”. Foodomika jako nauka ujmująca analitykę żywności i ocenę jej wartości biologicznej oraz odżywczej staje się kluczowym elementem na rzecz jakości życia obywateli, gdyż żywność i jej wartość odżywcza są podstawowymi czynnikami zdrowia publicznego, a w tym profilaktyki zdrowotnej. Zdrowie każdego obywatela jest w istotnej części funkcją jakości żywności, dlatego ocena wartości biologicznej żywności oparta o nowoczesne metody analityczne, m.in. NMR czy spektroskopia mas są zasadniczymi czynnikami utrzymania wysokiej jakości żywności w łańcuchu produkcyjnym.

Należy zatem wysoko ocenić podjęcie próby zastosowania technik NMR przez doktorantkę w aspekcie foodomiki w analizie surowców rolnych i żywnościowych produktów finalnych w wybranych procesach technologicznych.

2. Charakterystyka pracy, założenia i realizacja badań

Przedmiotem badań ujętych w tytule i celu pracy było zaprezentowanie możliwości i wykorzystanie metod analitycznych z użyciem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) jako narzędzi metabolomicznych w badaniach wybranych surowców rolnych i produktów żywnościowych.

Treść przedkładanej pracy została ujęta na 142 stronach, w tym 10 rozdziałów, a w zestawieniu bibliograficznym autorka wykorzystowała 180 pozycji literaturowych.

Cel i streszczenie pracy, a także wszelkie informacje dot. skrótów, symboli i spisu dokumentacji zostały ujęte w pierwszym fragmencie pracy (20 stron), co ułatwia czytelnikowi dalsze śledzenie treści rozprawy.

Przyjęty przez Autorkę system organizacyjny pracy obejmuje część I, tj.: ogólną i opisową, w tym: literaturową, opis przygotowania próbek i obróbka danych oraz opis badań własnych. W części II pracy przedstawiono opis doświadczenia z uwzględnieniem charakterystyki materiału, metod badawczych oraz wyniki, dyskusja, wnioski i posumowanie.

Cel pracy ujmuje poszukiwanie i optymalizację metod oceny jakości i przydatności żywieniowej surowców rolnych i produktów żywnościowych z uwzględnieniem technik spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Materiał badawczy stanowiły: a) mak spożywczy, b) jaja wzbogacane w biosubstancje, c) jaja pochodzące z czterech systemów chowu niosek, d) pięć gatunków zbóż.

We wstępie Autorka wyjaśniła niektóre definicje związane z biologią systemową oraz scharakteryzowała pojęcie foodomiki i jej znaczenie praktyczne. W dalszej kolejności zostały opisane techniki analityczne stosowane w metabiolomice i foodomice.

Jako ważne zagadnienie należy uznać metodykę przygotowania próbek i procedury obróbki danych z uwzględnieniem NMR. Autorka w przygotowaniu ww. materiału oparła się na najnowszych danych literaturowych.

W rozdziałach dot. badań własnych szczegółowo scharakteryzowano materiał badawczy, tj.: 1) mak spożywczy oraz sposób jego obróbki technologicznej w aspekcie zachodzących procesów podczas parzenia i jełczenia; 2) surowiec jajczarski z uwzględnieniem wzbogacania standardowej paszy stosując dodatek żyworódki pierzastej oraz w oddzielnym eksperymencie 3) surowiec jajczarski różnego pochodzenia, w tym z ekologicznego, wolnowybiegowego, klatkowego i ściółkowego chowu niosek, gdzie porównywano składy chemiczne jaj;

4) w czwartym eksperymencie porównano pięć gatunków zbóż oraz glebę z uwzględnieniem analizy zawartości pierwiastków.

Okolo ¼ objętości pracy stanowi opis wyników badań łącznie z dokumentacją. Niepełne 10% treści pracy stanowi dyskusja, wnioski i podsumowanie. Dokumentację całej pracy stanowią 44 rysunki w postaci diagramów oraz wykresów i 18 tabel.

3. Ocena merytoryczna pracy

Podjęta tematyka badawcza stanowi bardzo interesujący, a także skomplikowany obszar eksperymentalny, o dużym ciężarze gatunkowym i dużym znaczeniu, zwłaszcza w odniesieniu do możliwości analitycznych surowców rolnych i produktów żywnościowych z uwzględnieniem technik NMR. Generalnie jeśli wyniki badań będą publikowane w języku polskim należałoby zwrócić uwagę na niektóre skróty myślowe, literówki i styl.

Należy przyznać, że układ doświadczenia i organizacja badań zaprezentowana głównie w „celu pracy” (str.16) dla czterech grup eksperymentalnych jest mało precyzyjna, stwarzająca wrażenie powierzchowności, a w rzeczywistości jest to bardzo skomplikowany układ czterech eksperymentów. Stąd też może być trudna do zrozumienia przez czytelnika. Przez taki opis informacja o celu pracy jest zamazana. Należałoby zatem dokładnie sprecyzować cel pracy, a oddzielnie dla dobrej wizualizacji przedstawić stosowne schematy badań dla poszczególnych grup doświadczalnych. Należy pamiętać, że grupy doświadczalne zasadniczo się różnią i muszą mieć oddzielne schematy.

W streszczeniu (str. 17) razi słowo „różna pasza”. Pasza może być standardowa, niestandardowa, wzbogacona, z dodatkami itd.

Pozytywny odbiór przez czytelnika i przystępny opis i ciężar gatunkowy informacji sprawia „Wstęp” (str. 22-30).

W rozdziale II (str. 31 -54) opisano szczegółowo metodologię badań z uwzględnieniem przygotowania próbek do analizy NMR, proces analizy, z uwzględnieniem analizy chemometrycznej, metody walidacji i statystyczne. Przedstawiona treść jest w odczuciu recenzenta wysoce satysfakcjonująca i na dobrym poziomie.

W rozdziale III (str. 55 - 61) przedstawiono badania własne uwzględniające materiał badawczy, tj.: mak spożywczy w wielu wariantach. Jaja kurze, ich skład chemiczny w różnych wariantach produkcyjnych oraz kilka gatunków zbóż zwracając uwagę na jony metali ciężkich zarówno w glebie jak i w nasionach. Generalnie w tym rozdziale przedstawiono w zarysie procesy metaboliczne w ww. surowcach. Uwagi recenzenta budzą niektóre określenia, np.(str. 57), gdzie Autorka powołując się na literaturę nr 113 wskazuje na „sztuczne wzbogacanie” treści jaj w witaminy. W tym wypadku jest ponad wszelką wątpliwość naturalne wzbogacenie, które następuje w wyniku odpowiedniego żywienia niosek. Mowa o stosowaniu środków hormonalnych w żywieniu niosek jest delikatnej natury, gdyż trzeba to udowodnić, a stosowanie hormonów do pasz jest prawnie zabronione w UE, w tym w Polsce. Stosuje się coraz więcej w żywieniu niosek bioaktywnych substancji pochodzenia ziołowego w celu zachowania kondycji biologicznej i zdrowia niosek i ten kierunek jest przyszłościowy. Stąd zastosowanie w doświadczeniu żyworódki pierzastej ma pełne uzasadnienie.

Odnosząc się do części doświadczalnej dysertacji można w niej wyróżnić sześć rozdziałów, w tym: materiał badawczy, metody badań, wyniki, dyskusja, wnioski i podsumowanie.

Należy podkreślić, że w odniesieniu do materiału badawczego zadziwiająca dla recenzenta jest tak duża ilość wariantów badawczych, np. w odniesieniu do maku aż 15 wariantów (0,1,2,3,4 tygodnie po zmieleniu) oraz nieparzony, parzony i zbyt długo parzony. Podobnie w odniesieniu do jaj wzbogaconych z użyciem w żywieniu niosek żyworódki pierzastej. Tabela 2 przedstawia 6 wariantów pasz. Pytanie z czego wynikał udział żyworódki w Humokalwicie 52 i 36% oraz lucerny siewnej 6 i 13% oraz jaki cel miało zastosowanie pulpy z żyworódki i gliceryny? Ponadto dla recenzenta nie jest w pełni zrozumiała tabela 3.

Odnosząc się do próbek zbóż pojawia się pytanie; w jaki sposób ujednolicono próbki w grupie małej, średniej i dużej zawartości jonów metali ciężkich i doprowadzono do gleby (lepiej używać słów gleba niż ziemia) i jaki był cel tak szczegółowej dywersyfikacji próbek? Do którego pierwiastka odnoszono dane, gdyż nie ma to pokrycia w rzeczywistości, np. w tabeli 4 zawartość cynku (gleba/roślina).

Rozdział V obejmuje metody stosowane w badaniach metabolomicznych na wyżej opisanym materiale. Mak do badań pochodził z zakładu przetwórczego; w jaki sposób pobierano próbki i kiedy następował proces parzenia w firmie, czy w laboratorium? W efekcie finalnym użyto do badań supernatant zawierający składniki rozpuszczalne w 0,2 M buforze fosforanowym. Zatem nie można mówić o całym materiale badawczym a jedynie o określonej frakcji być może reprezentującej najważniejsze składniki. Podobnie sprawa dotyczy jaj wzbogaconych w biosubstancje pochodzące z paszy zawierającej żyworódkę. W tym przypadku w wyniku procesów ekstrakcyjnych wydzielono z żółtka dwie podstawowe frakcje, plazmę i granule., co określono w pracy „frakcja wodna i organiczna”. Z frakcji wodnej zawierającej również związki organiczne m.in. białka, peptydy i aminokwasy rozpuszczalne w roztworze 0,2 M buforu fosforanowego pobierano próbki do badań. Próbki te dotyczyły wyłącznie tej frakcji, a nie innych frakcji zwłaszcza tej granularnej, gdzie powinny być widoczne najlepiej efekty wzbogacania.

Ponieważ efekt wzbogacania dotyczy wyłącznie żółtka, to nie ma potrzeby badać białka jaja, gdyż tu nie należy się spodziewać efektów wzbogacania. Pewne wątpliwości recenzenta budzi czas przygotowania próbek do analiz NMR sięgający 5 – 8 godzin.

W opisie pomiarów NMR (str.72) wskazuje się, że w widmach zostało zastosowane tłumienie sygnału pochodzącego od wody. Czy nie należałoby uwzględnić bufor fosforanowy?

Odnosząc się do zaawansowanej chemometrycznej oraz statystycznej analizy danych (str. 74- 77) powstaje pytanie, dlaczego dla surowca jajczarskiego w eksperymentach (podrozdział 5.3.2. i 5.3.3.) odnotowujemy różne obszary sygnałów dla tych samych składników jaja (białko i żółtko) odpowiednio [4,50 -5,10 ppm żółtko i 4.20 -5,70 ppm białko i z drugiej strony 4,39 – 5,16 ppm żółtko i 4,47 – 5,18 białko]?

Rozdział VI dot. uzyskanych wyników badań odnoszący się do trzech grup surowców (mak, jaja i zboża). Należy podkreślić, że przygotowana dokumentacja jest na wysokim poziomie i może posłużyć opracowaniu wielu publikacji. Ponadto wyniki te po wnikliwym przeanalizowaniu, co nie dokonano w pełni w przedmiotowej dysertacji mogą stanowić kierunkowskazy do dalszych badań służących do wzmocnienia opracowań metodycznych dla surowców rolniczego pochodzenia i produktów żywnościowych. Stąd sugestia recenzenta dla promotora niniejszej dysertacji, o zastanowienie się nad opracowaniem szczegółowych metod analitycznych dla poszczególnych grup surowców rolnych i produktów spożywczych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w certyfikacji tych produktów.

Odnosząc się do szczegółów w tabeli 9 na str.88 i 89 w białku jaja wykazano cholinę, acetylocholinę, glicerol, a składniki te są wyłącznie charakterystyczne dla żółtka, chyba, że mamy doczynienie ze starym materiałem, gdzie nastąpiła dyfuzja tych związków z żółtka do białka przez błonę witelinową.

Rozdział VII. Dyskusja - ujęto na str.113 – 119. Autorka w standardowym układzie omawia i porównuje wyniki własne z danymi literaturowymi, jednakże recenzent dostrzegł kilka nieścisłości dot. skrótów myślowych i stylistyki opisu, np. (str. 113) „Podczas procesu parzenia próbki nieparzonego maku charakteryzowały się najwyższym poziomem lipidów..” (str. 114) „Początkowy wzrost poziomu alaniny w próbkach G zanika, by w próbkach T obserwować ich zmniejszenie.”

W części podrozdziału 7.2. Autorka wykazuje zdziwienie, że bioaktywne substancje nie zostały przeniesione z paszy do treści jaja. Należy pamiętać, że w procesie badawczym wykorzystano jedynie frakcję wodną, a więc związki rozpuszczalne w wodzie (lub w buforze fosforanowym). Natomiast w procesie przygotowania próbki odrzucono frakcję tzw. „organiczną”, gdzie na pewno znajdują się bioaktywne substancje pochodzące z paszy. Dlatego w przyszłości należałoby dokonać korekt metodycznych tak, aby korzystać w pełni z materiału badawczego. W podrozdziale 7.3. podobnie zdziwienie Autorki, że bardzo słabo transferowane są związki bioaktywne z paszy do treści jaj ekologicznych, ale to także może wynikać również z tego, że analizujemy wyłącznie frakcje wodne.

Rozdział VIII. Wnioski (str. 120 – 121) oraz rozdział IX Podsumowanie i wnioski (122 -123) są ze sobą bardzo powiązane i można je połączyć.

Od strony merytorycznej wnioski mają charakter opisowy transferujący informację z opisu w dyskusji. Zdaniem recenzenta wnioski winny być bardziej skondensowane i klarowne.

Przedstawione w dysertacji wyniki badań obejmują różne surowce i produkty pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a zastosowanie technik spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) wskazuje na szeroką możliwość wykorzystania przyjętej metodologii. Dlatego przeprowadzone badania należy traktować jako otwierające drogę do dalszych badań służących przygotowaniu nowoczesnych i prostych metod analitycznych dla konkretnych surowców i produktów.

Efekty tych badań mogą znaleźć szerokie zastosowanie praktyce, zwłaszcza w ocenie jakości wyrobów w łańcuchu produkcyjnym żywności, w tym „Traceability”, czy w badaniach zafałszowań żywności.

Autorka słusznie pisze (na str. 122), że „niniejsza praca jedynie fragmentarycznie porusza problemy analityki żywności ukazując zastosowanie metod metabolicznych”. Stąd jeszcze raz zachęcam do stworzenia platformy współpracy Politechniki, Uniwersytetu Przyrodniczego i Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ dot. utworzenia jednostki certyfikującej w zakresie analiz jakości i bezpieczeństwa żywności, która mogłaby służyć nowemu programowi dla Dolnego Śląska, jakim jest „Zielona Dolina Żywności i Zdrowia”, a w przyszłości mogłaby to być jednostka certyfikująca dla UE w ramach KIC Food4Future. Podobny też zamysł postawiła Autorka niniejszej pracy w ostatnim akapicie na str. 123.

Recenzent odnosząc się do listy publikacji własnych (str. 124- 125) i zestawienia bibliografii w rozdziale X chce mocno podkreślić wysoki poziom przygotowania Doktorantki do podjęcia się tak trudnych badań, a dalej rzetelności i doprowadzenia do sukcesu w wyniku osiągnięcia a nawet przekroczenia postawionych zamierzeń dysertacji. Niewątpliwie Promotor pracy i atmosfera w zespole sprzyjała temu osiągnięciu.

4. Uwagi końcowe

Recenzja pracy doktorskiej „*Zastosowanie spektroskopii NMR w analizie metabolicznej produktów spożywczych i płodów rolnych*” Pani mgr inż. Ewy Jawień i przedstawiona ocena merytoryczna ujęta w punkcie 3, w tym uwagi krytyczne nie umniejszają jej wartości zarówno poznawczej jak i praktycznej.

Uwzględniając całokształt, tj. wybór tematu, szeroką wiedzę Doktorantki, w tym znajomość najnowszej literatury, dobór materiału i biegłość analityczną, a także precyzyjnie przygotowana dokumentacja wyników oraz możliwości ich wykorzystania w publikacjach, patentach, opracowaniach metodycznych upoważniają recenzenta do stwierdzenia oryginalności pracy i jej wysokiej wartości naukowej i praktycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że praca spełnia kryteria dla dysertacji doktorskich określonych w dokumentach prawnych o stopniach naukowych i tytule naukowym . W związku z powyższym uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Ewy Jawień do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając duże zaangażowanie Doktorantki i wkład intelektualny, a także ogromny nakład czasu pracy w laboratorium recenzent proponuje wyróżnienie pracy.



Wrocław, 19.09.2016 r.

prof. dr hab. inż. Tadeusz Trziszka