

Łódź, dn.15.08.2019

Dr hab. inż. Joanna Leszczyńska
Zespół Bromatologii
Instytut Podstaw Chemii Żywności
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
Ul. Stefanowskiego 4/10
joanna.leszczynska@p.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Przybylskiej nt: Chromatograficzne metody ekstrakcji i oznaczania patuliny w owocach głogu (*Crataegus spp.*) stanowiących składniki żywności funkcjonalnej i suplementów diety

Podstawę do opracowania recenzji stanowiło pismo Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie dn. 26.06.2019r dr hab. Agnieszki Tórz, prof. ZUT z prośbą o dokonanie oceny pracy doktorskiej mgr Anny Przybylskiej pt.: Chromatograficzne metody ekstrakcji i oznaczania patuliny w owocach głogu (*Crataegus spp.*) stanowiących składniki żywności funkcjonalnej i suplementów diety.

Znaczenie badań podjętych w pracy

Temat podjęty w pracy uważam za niezwykle istotny, ponieważ dotyczy on problemów zdrowia, żywienia, a dokładniej – żywności funkcjonalnej i suplementów diety. W ostatnich latach daje się zauważyć znaczny wzrost podaży suplementów diety. Jednakże poziom kontroli suplementów diety nie można uznać za satysfakcjonujący, zarówno pod kątem ich działania prozdrowotnego, jak i zawartości składników potencjalnie szkodliwych. Wiele suplementów diety jest nieprzebadanych i nie podlega odpowiedniej kontroli. Jednym z elementów kontroli żywności w tym suplementów diety jest analiza poziomu mikotoksyn. W recenzowanej pracy podjęto próbę opracowania patuliny w owocach głogu, stanowiącym suplement diety. Pomimo, że do najbardziej toksycznych należą aflatoksyny, to patulina jest jedną z najbardziej powszechnie występujących mikotoksyn.

Surowce roślinne mogą być pozyskiwane ze stanu naturalnego, plantacji oraz upraw ekologicznych. Mimo, że plantacje zajmują ok. 30 tys. ha, to ponad 200 gatunków roślin leczniczych jest zbieranych ze stanu naturalnego. Wiele z tych surowców może być zanieczyszczonych mikrobiologicznie, w tym szczepami pleśni z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus* odpowiedzialnych za produkcję metabolitów wtórnych, w tym mikotoksyn, również patuliny. Na podstawie dostępnej literatury można stwierdzić, że w produktach zielarskich oznaczano zawartość takich mikotoksyn jak: ochratoksyna, fumonizyna, aflatoksyna, zearalenon, toksyna T-2 i womitoksyna. Natomiast patulina rzadko była obiektem badań, mimo przypisywania jej właściwości rakotwórczych, mutagennych i teratogennych oraz powszechności jej występowania.

Biorąc pod uwagę rosnący rynek suplementów diety, tendencje dotyczące zaleceń w żywieniu człowieka, a także zalecenia dotyczące bezpieczeństwa żywności wybór problematyki badawczej przedstawionej do oceny pracy uważam za oryginalny i interesujący nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale także z punktu widzenia konsumenta.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny praca ma nietypową formę, ponieważ składa się z 5 publikacji oraz streszczenia badań nieopublikowanych. Ze względu na formę pracy ocena merytoryczna i formalna pracy nie jest zbyt łatwa. Badaniom związanym z określeniem zawartości patuliny są poświęcone właściwie z pięciu włączonych do dysertacji publikacji jedynie trzy [P1, P2, P5]. Przedstawienie rozprawy w postaci jednolitego opracowania ułatwiłoby jej ocenę.

Tematem pracy są chromatograficzne metody ekstrakcji i oznaczania patuliny w owocach głogu stanowiących składniki żywności funkcjonalnej i suplementów diety. Tymczasem opracowywana procedura dotyczy nie tylko owoców głogu, ale także jabłek, które są najczęściej zanieczyszczone patuliną. W opracowaniu znalazły się również wyniki oznaczania zawartości hydroksykwasów, antyoksydantów i właściwości antyoksydacyjnej w naparach oraz zawartości składników mineralnych w badanych produktach. Te zagadnienia nie są zawarte w temacie pracy i dość luźno łączą się z tematem. Praca zyskałaby na spójności i czytelności, gdyby była przedstawiona w postaci jednolitego opracowania – monografii lub cyklu publikacji.

Zastrzeżenia budzi tytuł rozprawy. W mojej opinii temat rozprawy powinien być sformułowany bardziej ogólnie, ponieważ nie dotyczy wyłącznie problemów analitycznych związanych z analizą zawartości patuliny, ale również zawiera szereg wyników oznaczania związków biologicznie aktywnych: antyoksydantów, mikroelementów i in. Mógłby brzmieć np. „Charakterystyka mikrobiologiczna i chemiczna wybranych produktów zielarskich zawierających owoce głogu”, co bardziej oddawałoby zawartość rozprawy.

Sformułowanie we wstępie „samouzdrawiające możliwości ciała ludzkiego” budzi wątpliwości mojego ścisłego i analitycznego umysłu. Aczkolwiek jest to – oczywiście – uwaga dyskusyjna.

W części teoretycznej Doktorantka opisuje zanieczyszczenia mikrobiologiczne surowców roślinnych, szczególny nacisk kładąc na zanieczyszczenia mikotoksynami. Fragment poświęcony bytowaniu mszyc i afidofagów, aczkolwiek ciekawy, dość luźno łączy się z tematem pracy. Doktorantka słusznie podkreśla niewielką ilość badań poświęconych oznaczaniu zawartości patuliny. Kolejny rozdział dotyczy charakterystyki owoców głogu z punktu widzenia botanicznego, chemicznego oraz użytkowego, czyli zastosowania. Doktorantka dość dobrze i szczegółowo opracowała rozdział dotyczący biosyntezy, właściwości i występowania patuliny. Bardzo dobrze oceniam rozdziały poświęcone metodom ekstrakcji i oznaczania patuliny, pomimo, że metody dotyczą głównie jabłek. Uważam, że ciekawym i dobrze uzasadnionym pomysłem jest próba zastosowania nanorurek do analizy patuliny w owocach głogu. W mojej ocenie część teoretyczna jest dobrze opracowana.

Ogólny cel pracy oraz cele szczegółowe zostały precyzyjnie określone, aczkolwiek nie w pełni jasna pozostaje dla mnie hipoteza badawcza. W szczegółowych celach badań cel 4 nie mieści się w zakresie pracy. Nie wszystkie cele znajdują odzwierciedlenie we wnioskach. Oznaczania patuliny dotyczą wnioski 5 i 6. Wnioski 7, 8 i 9 są bardzo ogólnikowe. Brakuje mi syntezy badań i przedyskutowania związku między zawartością patuliny i zawartością innych oznaczanych związków w badanych produktach.

Wśród przedstawionych do oceny publikacji, będących podstawą rozprawy doktorskiej jedna dotyczy chromatograficznych metod ekstrakcji i separacji stosowanych do oznaczania patuliny w owocach i sokach owocowych, jest pracą przeglądową, w zasadzie nie dotyczy owoców głogu, ale jabłek. Patuliny dotyczy jedynie dwie prace: „A comparison of the

selectivity of Nano-HPTLC systems used for determination of patulin in fruit juices from the internet stores and pharmacies” i “Advantageous extraction, Cleanup and UHPLC LC-MS/MS detection of patulin mycotoxin in dietary supplements and herbal blends containing hawberry from *Crataegus* spp.”. Pozostałe są dość luźno związane z pracą doktorską. Jedna z nich dotyczy zanieczyszczeń mikrobiologicznych, a druga zawartości związków bioaktywnych w naparach z owoców głogu.

W części opisowej i publikacji [Przybylska, Bazylak; 2017] Doktorantka zawarła m.in. wyniki oznaczania wskaźników jakości higienicznej suplementów diety oraz mieszanek ziołowych zawierających suszone owoce głogu. Wyniki tych badań dość luźno wiążą się z tematem pracy. Autorka rozprawy nie wykazała związku z zanieczyszczeniem mikrobiologicznym a zawartością patuliny. Podobnie w przypadku prac poświęconych zawartości mikroelementów (Mn, Fe, Cu i Zn) [Bazylak i wsp. 2014; Bazylak i wsp. 2017ab] w suplementach diety i mieszankach ziołowych – przeprowadzone badania są dość słabo powiązane z tematem pracy. Prawdopodobieństwo hamowania rozwoju patogenów odpowiedzialnych za produkcję patuliny przez oznaczane mikroelementy i związek z zawartością patuliny jest słabo udokumentowane. Analiza zawartości hydroksykwasów w naparach z suszonych owoców głogu i kwiatostanów głogu jest z pewnością zagadnieniem ciekawym, ale dość luźnie łączy się z tematem pracy. Autorka nie wykazała związku między zawartością hydroksykwasów a stężeniem patuliny w badanych produktach. Możliwość zmniejszania przez oznaczane hydroksykwasy zawartości patuliny w badanych produktach nie jest wystarczająco uzasadniona.

Ocena merytoryczna

Podjęte przez Doktorantkę badania mają bardzo duże znaczenie, zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne. Autorka wykazała pełne przygotowanie teoretyczne, jak i pod względem warsztatowym. Za bardzo cenny kierunek badań uważam zastosowanie nanorurek do izolowania patuliny.

Bardzo dobrze oceniam badania przeprowadzone nad ekstrakcją patuliny metodą SPE, w których wykazano wysoką przydatność nanorurek węglowych do izolowania patuliny w różnych zakresach stężeń. Aczkolwiek sposób przedstawiania wyników w tabeli 12 budzi moje wątpliwości co do jasności i czytelności przekazu – rubryka „Odzysk (RSD) LOD powinien być moim zadaniem w nagłówku tabeli. Uzyskane wyniki badań przeprowadzonych

na roztworach modelowych i soku jabłkowym zastosowano do ekstrakcji patuliny z owoców głogu.

Szkoda, że wyników badań wskaźników jakości higienicznej nie powiązano z zawartością patuliny. Podobne wyniki oznaczania zawartości hydroksykwasów: kwasu cytrynowego i L-jabłkowego, winowego i szczawiowego w naparach nie powiązano z zawartością patuliny: wykazano korelacje między stężeniami poszczególnych kwasów i stopniem rozdrobnienia, ale nie przeanalizowano wpływu oznaczanych kwasów na zawartość patuliny.

Cenne są badania nad analizą zawartości kwasu askorbinowego, związków polifenolowych oraz flawonoidów w naparach zawierających owoce głogu. Wyniki powiązano z aktywnością antyoksydacyjną oznaczoną za pomocą redukcji rodnika DPPH oraz kationorodnika ABTS oraz zawartością kwasu cytrynowego i L-jabłkowego. Brakuje przedyskutowania i analizy wpływu oznaczonych związków na zawartość patuliny, która jest tematem pracy. Podobny zarzut nasuwa się w przypadku publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej a opisującej zawartość mikroelementów: Mn, Fe, Cu, Zn. Pierwiastki te mają istotny wpływ na działanie układu immunologicznego, ale związek z zawartością patuliny jest słabo udokumentowany. Brakuje również porównania z innymi produktami zielarskimi. Pozytywnie i wysoko oceniam opracowanie statystyczne otrzymanych wyników.

Jako wartościowe i oryginalne oceniam również wyniki badań z zastosowaniem nanorurek węglowych do ekstrakcji patuliny.

Jak słusznie zauważyła Doktorantka stwierdzono brak korelacji między zawartością patuliny w poszczególnych produktach a ogólną liczbą pleśni, ponieważ biosynteza patuliny jest cechą charakterystyczną danego szczepu pleśni.

Dyskusja uzyskanych wyników nie była zadaniem łatwym, ale Doktorantka poradziła sobie z nim stosunkowo dobrze, aczkolwiek brakuje mi w pracy mechanizmów wyjaśniających związek między zawartością patuliny a zawartością oznaczanych związków biologicznie aktywnych: antyoksydantów, hydroksykwasów, mikroelementów i in.

Na podstawie przedstawionej pracy z całą odpowiedzialnością mogę stwierdzić, że Autorka w pełni opanowała umiejętność posługiwania się warsztatem badawczym z zakresu wybranego kierunku badawczego, wykazała przy tym krytycyzm w odniesieniu do stosowanych metod analitycznych i uzyskanych wyników.

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji praca magister Anny Przybylskiej „Chromatograficzne metody ekstrakcji i oznaczania patuliny w owocach głogu (*Crataegus* spp.) stanowiących składniki żywności funkcjonalnej i suplementów diety” charakteryzuje się wysoką wartością merytoryczną wykonanych badań, spełnia kryteria prawidłowo zaplanowanej, zrealizowanej i udokumentowanej rozprawy doktorskiej. Wnoszę zatem do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa o dopuszczenie magister Anny Przybylskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. inż., prof. PŁ


Joanna Leszczyńska