



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wojska Polskiego 28

60-637 Poznań

tel. +48 61 848 73 52

e mail: kbiaz@up.poznan.pl

WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIU

Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Poznań, 5.02.2021r.

Prof. UPP, dr hab. inż. Dorota Piasecka-Kwiatkowska

Katedra Biochemii i Analizy Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ul. Mazowiecka 48

60-623 Poznań

RECENZJA

Pracy doktorskiej mgr inż. Patrycji Sowy

pt. „Wpływ dodatku nostryka białego (*Melilotus albus*)

na zawartość związków biologicznie czynnych w miodach nektarowych”

wykonanej w Zakładzie Chemii i Toksykologii Żywności Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytetu Rzeszowskiego

Promotor: prof. UR dr hab. inż. Małgorzata Dżugan

promotor pomocniczy: dr inż. Maria Tarapatskyy

Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Podstawę opracowania niniejszej recenzji stanowiło pismo Prorektora ds. Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego prof. dr hab. Idalii Kasprzyk z dn.1.12.2020r. wynikające bezpośrednio z uchwały nr 19/11/2020 Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 19 listopada 2020 roku.

Komentarz wstępny

W ostatnich latach w społeczeństwie znacznie wzrosła świadomość istotnej roli jaką odgrywa właściwe odżywienie i zdrowy styl życia człowieka w codziennym funkcjonowaniu i zachowaniu dobrej kondycji na długie lata. Z całą pewnością wpływa to też na preferencje i gusty konsumentów, którzy obecnie znacznie częściej sięgają po produkty naturalne, ekologiczne tylko w niewielkim stopniu przetworzone, słusznie upatrując w nich źródło składników prozdrowotnych. Do tej grupy produktów zaliczają się między innymi produkty pszczele, a wśród nich szczególne miejsce zajmuje bogaty w liczne składniki bioaktywne miód, którego dobroczynne działanie było znane i wykorzystywane od najdawniejszych czasów. Zaawansowane techniki i narzędzia analityczne, które mają do dyspozycji współcześni analitycy pomagają określać skład do tej pory niewykorzystywanych surowców, będących często nieznanym, a bogatym źródłem składników bioaktywnych. Uzyskane w ten sposób informacje mają przełożenie aplikacyjne - stanowią podstawę do opracowywania i konstruowania nowych, innowacyjnych produktów o właściwościach prozdrowotnych.

W ten sposób wychodząc naprzeciw oczekiwaniom współczesnych konsumentów, poszukujących tego typu produktów: naturalnych, zawierających składniki bioaktywne. Badania prowadzone przez Doktorantkę doskonale wpisują się w ten nurt.

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, mgr inż. Patrycja Sowa uwzględniając różne aspekty i wykorzystując różne techniki i narzędzia analityczne oceniła możliwość wykorzystania nostryka białego jako dodatku do miodu nektarowego pod kątem wzbogacania go w składniki bioaktywne. **Biorąc pod uwagę powyższe, zarówno wybór tematyki pracy doktorskiej mgr inż. Patrycji Sowy, jak również sposób jej realizacji uważam za interesujące, mające charakter nowości naukowej.**

Formalna ocena pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska ma charakter eksperymentalny i została opracowana w formie monografii zawartej na 174. stronach maszynopisu. Można w niej wyodrębnić dwie zasadnicze części: teoretyczną (30 stron) i badawczą (100 stron), których wzajemne proporcje objętości są właściwe dla prac eksperymentalnych.

Opracowanie ma strukturę, typową dla klasycznych rozpraw doktorskich: rozpoczyna je rozdział zatytułowany Wstęp, w którym zamieszczono przegląd piśmiennictwa; Cel pracy i hipotezy badawcze; Układ doświadczenia; Materiał i metody; Wyniki i dyskusja; Podsumowanie i wnioski; Bibliografia oraz Aneks. Na końcu zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim.

W pracy znajduje się 37 tabel, w tym wyniki badań uzyskane podczas realizacji pracy zaprezentowano w 29. tabelach, w tym 18 znajduje się w głównej części pracy a 11 w zamieszczonym na końcu dysertacji aneksie. W manuskrypcie znajduje się też 49 rysunków (rycin i fotografii), z czego 8 odnosi się do części literaturowej, 6 charakteryzuje badany materiał, a pozostałe 35 dokumentują wyniki. W załączonym na końcu pracy Aneksie Autorka w 11. tabelach zamieściła szczegółowe wyniki swoich analiz, w tym wyniki analizy statystycznej. W tej części zamieściła też dwa przykładowe chromatogramy.

Wykaz piśmiennictwa obejmuje 223 pozycje literaturowe i dwa źródła z zasobów internetowych. Wśród zacytowanych pozycji prawie 70% stanowią prace opublikowane w ciągu ostatnich 10. lat a około 40% przypada na lata 2016-2020. Praca jest napisana ładnym językiem, bardzo starannie przygotowana edytorsko z pojedynczymi błędami edytorskimi, co nie wpływa na jakość tekstu.

Podsumowując tę część oceny pracy mogę stwierdzić, że recenzowana praca spełnia wszystkie formalne wymagania stawiane rozprawom naukowym.

Ocena merytoryczna rozprawy

Po zapoznaniu się z treścią pracy stwierdzam, że **tytuł pracy został sformułowany w sposób prawidłowy, zwięźle i adekwatnie do jej treści. Zastrzeżeń nie budzą także zamieszczone na końcu opracowania streszczenia (zarówno polska, jak i angielska wersja)**, które w syntetyczny sposób opisują badania wykonane przez Doktorantkę uwzględniając wynikające z nich najważniejsze wnioski.

Przegląd piśmiennictwa

W pierwszej części pracy (Rozdział WSTĘP) Autorka dokonuje przeglądu piśmiennictwa i wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji. Adekwatnie do niej i do prowadzonych badań, w logiczny sposób, wyodrębniła cztery główne podrozdziały. W pierwszym szczegółowo omówiła skład chemiczny miodów odmianowych, uwzględniając cechy organoleptyczne, właściwości fizykochemiczne, zwracając szczególną uwagę na zawartość składników bioaktywnych. W kolejnym rozdziale omówiła sposoby otrzymywania oraz właściwości miodów o podwyższonej zawartości składników bioaktywnych, uwzględniając ziołomiody, jak również miody wzbogacane w różne dodatki. Następnie bardzo szczegółowo scharakteryzowała nostryk należący do rodziny roślin motylkowych, który wykorzystywała w swoich badaniach. Ostatni podrozdział tej części pracy poświęcony został charakterystyce miodu nostrykowego.

Podsumowując tę część pracy stwierdzam, że Pani Magister w rzetelny i ciekawy sposób, korzystając z właściwie dobranych źródeł, wprowadza w przedmiot swoich badań ukazując ich zasadność. Ta część pracy została opracowana, na podstawie trafnie dobranej bibliografii, wskazując na dużą wnikliwość pani mgr inż. Patrycji Sowy. Dobór merytoryczny źródeł oraz sposób ich wykorzystania uważam za prawidłowy.

Cel pracy i hipotezy badawcze

Doktorantka jasno sprecyzowała główny cel pracy, „analiza wpływu dodatku nostryka białego (*Melilotus albus*) na zawartość związków bioaktywnych i aktywność biologiczną miodów nektarowych”, który jest spójny z tytułem rozprawy. Dodatkowo bardzo trafnie sformułowała cztery cele szczegółowe, które wytyczyły logiczne etapy badań, konsekwentnie prowadzące do realizacji głównego celu rozprawy.

W oparciu o aktualny stan wiedzy, który został przedstawiony w przeglądzie literatury, Doktorantka trafnie sformułowała trzy hipotezy badawcze. Weryfikacja ich jest spójna z wyznaczonym celem pracy.

Metodyka pracy

Ta część pracy obejmuje dwa główne rozdziały: Układ doświadczenia oraz Materiał i metody.

W pierwszym Doktorantka grupuje zadania badawcze wyodrębniając trzy etapy, w ramach których będzie realizować badania, jednocześnie wskazując analizy, które będą realizowane na poszczególnych etapach. Ten rozdział pozwala czytelnikowi zapoznać się z układem doświadczenia, co jest szczególnie istotne przy wielowątkowych, szczegółowych badaniach i analizach, jakie prowadziła Doktorantka. **Podsumowując tę część stwierdzam, że układ doświadczenia został przez mgr inż. Patrycję Sowę przemyślany, prawidłowo i logicznie zaplanowany.** W kolejnym rozdziale bardzo starannie i szczegółowo opisany został badany materiał, którym był miód nostrykowy, rośliny nostryka białego i żółtego oraz miody rzepakowy i lipowy wzbogacane suszonym

dotatkiem nostrzyka lub jego liofilizowanym ekstraktem. Ta część pracy została dodatkowo udokumentowana ciekawym materiałem fotograficznym. W dalszej części tego rozdziału skrupulatnie i prawidłowo opisano poszczególne metody analityczne, które były stosowane w trakcie realizacji badań. Tę część kończy opis zastosowanych metod statystycznych i programów komputerowych. **Uważam, że metodyka pracy została przedstawiona w sposób właściwy, nie budzący żadnych zastrzeżeń.**

Wyniki i ich omówienie

Najobszerniejszą część dysertacji, stanowiącą aż 73 strony, stanowi rozdział, w którym Autorka zaprezentowała i omówiła wyniki swoich badań. Ten rozdział został podzielony na cztery części – analogicznie do wyznaczonych celów szczegółowych.

Pierwsza część dotyczy szczegółowej analizy miodów nostrzykowych. Autorka analizowała 30 miodów, które zgodnie z deklaracją pszczelarzy, od których je bezpośrednio pozyskała, zostały zakwalifikowane jako miody odmianowe. W ramach badań wykonano analizę melisopalinologiczną, określono parametry fizyko-chemiczne, aktywność antyoksydacyjną oraz zawartość związków fenolowych. Wyznaczono także profil białkowy, profil związków fenolowych i związków lotnych. Po przeprowadzeniu analizy pyłkowej tylko w przypadku 14. spośród 30. dostarczonych do badań próbek potwierdzono prawidłową klasyfikację odmianową. Pozostałe nie zawierały wymaganej ilości pyłku przewodniego i dlatego zostały niewłaściwie zakwalifikowane jako nostrzykowe. Taka sytuacja nie jest wyjątkowa, błędna klasyfikacja odmiany miodu jest częstym zjawiskiem. Brakuje bowiem specyficznych, prostych narzędzi analitycznych, które umożliwiałyby klasyfikację odmianową miodów. Obecnie odbywa się ona najczęściej na podstawie deklaracji pszczelarzy przypisujących odmianę w zależności od terminu zbioru i kwitnienia roślin miododajnych na danym terenie. Niestety takie postępowanie jest niewystarczające i często może być przyczyną zafałszowań. Na zawartość pyłku przewodniego w miodzie mogą wpływać różne czynniki, np. wielkość obszaru zajmowanego przez miododajny pożytek, ale także obecność w pobliżu innych roślin nektarujących, czy też roślin wiatropylnych. Mimo, że od wielu lat poszukuje się parametrów fizykochemicznych różnicujących poszczególne odmiany miodów nektarowych, mogących stanowić podstawę do opracowania metod instrumentalnych identyfikujących odmianę miodu, ciągle brakuje odpowiednich procedur analitycznych. Jedyną metodą odwoławczą w sprawach spornych jest analiza pyłkowa, która ze względu na złożoność interpretacji jest akredytowana zaledwie w kilku laboratoriach analitycznych w Polsce. Także działania podjęte przez Doktorantkę nie pozwoliły w oparciu o przeprowadzane analizy na jednoznaczne odróżnienie próbek zafałszowanych odmianowo. Jak zauważyła w podsumowaniu tej części pracy Doktorantka, bez analizy pyłkowej nie można jednoznacznie określić autentyczności odmianowej miodu.

W kolejnej części scharakteryzowano nostrzyk jako źródło bioaktywnych związków fenolowych. Głównym celem tej części pracy było wytypowanie materiału roślinnego do wytworzenia miodu wzbogaconego w składniki bioaktywne. Doktorantka z wnikliwością podeszła do rozwiązania tego problemu. W badaniach uwzględniła dwa gatunki nostrzyka (żółty i biały), dwie formy (jednoroczny i dwuletni), różne części rośliny (kwiaty, łodygi, liście),

a także różne fazy wegetacji. Określiła też wpływ procesu suszenia kwiatów i liści nostrzyka na zawartość związków bioaktywnych. Aby zapewnić wiarygodność uzyskiwanym wynikom przed przystąpieniem do właściwych oznaczeń profilu związków fenolowych metodą HPLC-PDA w badanym materiale Autorka przeprowadziła dwie optymalizacje: wyodrębniania związków fenolowych z roślinnej matrycy i warunków prowadzenia rozdzielu chromatograficznego. W uzyskanych ekstraktach stwierdziła występowanie 11 substancji bioaktywnych, które zakwalifikowała do trzech grup: związki kumarynowe (kumaryna, umbeliferon), kwasy fenolowe (kwas melilotowy, kwas o- i p-kumarowy, glikozyd kwasu o-kumarowego) i flawonoidy (kwercytyna, hiperozyd, luteolina, oraz glikozydy kwercytyny i kemferolu). W tej części pracy scharakteryzowano także aktywność antyoksydacyjną nostrzyka. Uzyskane wyniki poddano wielowymiarowej analizie statystycznej (analiza głównych składowych, analiza skupień, mapa cieplna), która pozwoliła wytypować odpowiednio materiał roślinny do wzbogacania miodów w składniki bioaktywne. Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości związków bioaktywnych w badanych dwóch gatunkach nostrzyka, białym i żółtym, a do wzbogacania miodów wytypowano kwiaty i liście nostrzyka białego dwuletniego oraz nostrzyka jednorocznego.

W kolejnych rozdziałach mgr Patrycja Sowa zaprezentowała wyniki badań związane z przygotowaniem (ustalenie proporcji i formy dodatku i odmiany miodu) i oceną właściwości miodu wzbogaconego dodatkiem nostrzyka białego. W tej części pracy szczególnie interesujące są wyniki oceny jakości miodu wzbogaconego nostrzykiem, zawierające między innymi analizę sensoryczną, ocenę bezpieczeństwa spożycia, a także analizę aktywności biologicznej obejmującą aktywność przeciwdrobnoustrojową, metaboliczną i proliferacyjną komórek IPEC-1 i właściwości przeciwwazakrzepowe.

Niewątpliwie mocnym elementem podczas prezentacji wyników pracy jest ich dyskusja. Pani mgr inż. Patrycja Sowa wnikliwie analizuje, wyjaśnia i dyskutuje swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły. Bez wątpienia osiągnięciem Doktorantki jest opracowanie i wytworzenie innowacyjnego produktu jakim jest miód wzbogacony nostrzykiem o dobrych cechach sensorycznych i potwierdzonej badaniami zwiększonej aktywności biologicznej.

Część badawczą dysertacji kończy rozdział Podsumowanie i wnioski, w którym Autorka na podstawie uzyskanych wyników poprawnie sformułowała 10 wniosków. Na zakończenie zamieściła krótkie podsumowanie, które moim zdaniem, powinno pojawić się raczej przed sformułowaniem ostatecznych wniosków.

Po przeczytaniu pracy nasuwają się następujące drobne uwagi i pytania

1. Wątpliwości budzą wyniki analizy elektroforetycznej, które mam nadzieję, będę mogła przedyskutować z Doktorantką w trakcie obrony:

Na stronie 109 w omówieniu wyników elektroforezy znajduje się stwierdzenie „W oparciu o przeprowadzone rozdzielanie elektroforetyczne stwierdzono, że miód nostrzykowy zawiera więcej białka w porównaniu do analizowanych miodów wzbogaconych (najwyższa intensywność zaobserwowanych pasm białkowych), zarówno w elektroforezie natywnej i jak i SDS-PAGE”, które jest niezrozumiałe.

Elektroforegramy nie informują o zawartości białka, a jedynie o zawartości określonych frakcji białkowych w ekstrakcie. W zależności od zastosowanej techniki, o frakcjach różniących się ruchliwością elektroforetyczną, która wynika z wypadkowego ładunku oraz kształtu cząsteczki (natywna PAGE) lub wielkością cząsteczki, bezpośrednio związana z masą cząsteczkową (SDS-PAGE). Widok prążków białkowych na żelu wynika też ze sposobu przygotowania próbek bezpośrednio nanoszonych na żel. W przypadku elektroforezy SDS-PAGE – zgodnie z metodyką opisaną w na stronie 52 (pkt. 4.2.7.2) próbki te były denaturowane, a do każdej studzienki nanoszono standaryzowaną, jednakową ilość 20µg białka. Dlaczego miałyby w takim razie różnić się zawartością białka?

Proszę wyjaśnić cel przeprowadzenia elektroforezy PAGE (w warunkach natywnych) z barwieniem Coomassiego? Jakich dodatkowych informacji w stosunku do elektroforezy SDS-PAGE miały dostarczyć?

W trakcie interpretacji elektroforegramów warto zastosować analizę densytometryczną, która ułatwiłaby jednoznaczną interpretację wyników – porównanie intensywności prążków, czy wyznaczanie mas cząsteczkowych odbywa się na podstawie obiektywnych zmierzonych parametrów, a nie subiektywnej oceny wzrokowej.

2. Bardzo drobne błędy edytorskie: na stronie 59 błędnie wpisano analiza cieplna, zamiast cieplna, na str. 74 błędnie wskazano nr tabeli, w której zamieszczono wyniki analizy związków lotnych metodą GC (jest A5, powinno być A4), w rozdziale 4. MATERIAŁ I METODY błędnie podano numer podrozdziału 4.1.3. Odczynniki chemiczne, któremu nadano taki sam numer jak poprzedniemu 4.1.3. Miód wzbogacany.

Przedstawione powyżej uwagi mają jedynie charakter dyskusyjny i nie wpływają na wartość ocenianej pracy.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Problematyka badawcza poruszana w przedstawionej do oceny dysertacji doskonale wpisuje się w bardzo aktualny nurt badań związanych z produkcją żywności o podwyższonej aktywności biologicznej, a uzyskane wyniki mają znaczenie poznawcze, ale również aplikacyjne.

Rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Sowy jest dowodem kompetencji Autorki do planowania badań, ich wykonania, następnie analizowania, omawiania i dyskutowania uzyskanych rezultatów z wynikami innych autorów w formie przyjętej dla publikacji naukowych. Mnogość technik analitycznych zastosowanych przez Doktorantkę w trakcie realizacji pracy i w konsekwencji ogrom uzyskanych wyników są imponujące. Świadczą one o bardzo wnikliwym podejściu do rozwiązania postawionego problemu badawczego. Kompetentna analiza wyników różnych analiz i połączenie ich w logiczną całość świadczą o dojrzałości naukowej mgr inż. Patrycji Sowy.

Podsumowując stwierdzam, że dysertacja mgr inż. Patrycji Sowy spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane pracom na stopień doktora (art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14.03.2003r. Dz.U.nr 65, poz.595, z późn. zm. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki) i wnoszę do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie pani mgr inż. Patrycji Sowy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

D. Piasecka-Kwiatkowska

Prof. UPP dr hab. inż. Dorota Piasecka-Kwiatkowska