

## **Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Pauli Kuźmy pt.: „Wykorzystanie chiralnej chromatografii do oceny jakości miodów spadziowych”**

### **1. Uwagi formalne**

Podstawą opracowania recenzji stanowi pismo prof. dr hab. Mirosława Słowińskiego Dziekana Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dn. 26.11.2018 r. skierowane do mnie w sprawie dokonania oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauli Kuźmy na temat: „Wykorzystanie chiralnej chromatografii do oceny jakości miodów spadziowych”. Opinię opracowano na podstawie egzemplarza pracy doktorskiej (część A) mgr inż. Pauli Kuźma otrzymanej wraz z pismem w dniu 05.12.2018 r. stanowiącej formę maszynopisu składającego się z 147 stron wraz z załącznikiem (część B) zawierającym wykaz osiągnięć na stronach 148 - 151.

### **2. Ogólna ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauli Kuźmy pt.: „Wykorzystanie chiralnej chromatografii do oceny jakości miodów spadziowych”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma głównie charakter empiryczny i dotyczy badań związanych z wykorzystaniem chromatografii chiralnej do oceny jakości polskich miodów spadziowych. Autorka wykorzystywała chromatografię chiralną do oznaczania w miodach spadziowych pochodzących z różnych obszarów Polski, zawartości chiralnych związków lotnych oraz chiralnych wolnych aminokwasów. Następnie wykorzystując analizę chemometryczną opartą na analizie skupień (CA) i analizie składowych głównych (PCA) w oparciu o wcześniej wyznaczone zawartości związków chiralnych (lotnych i wolnych aminokwasów) jako wyróżników (markerów) przeprowadziła analizę oceny identyfikowalności geograficznej polskich miodów spadziowych. Pracę kończy dyskusja uzyskanych wyników i wnioski.

Praca składa się z 6 rozdziałów, które obejmują w sumie 92 strony, a ze streszczeniami (w języku polskim i angielskim), spisem treści, wykazem, skrótów, piśmiennictwem, aneksem (zawierającym 9 tabel i jeden rysunek) obejmuje 147 stron. Na ostatnich 4-ech stronach (148-151) autorka zamieściła wykaz swoich osiągnięć naukowych.

Poniżej zamieszczono krótki opis zawartości pracy.

Rozdział 1 „Wstęp” zawarty jest na dwóch stronach (11-12). Autorka zdefiniowała w nim miód spadziowy. Zwróciła uwagę na wagę identyfikacji pochodzenia żywności i określenia autentyczności botanicznej oraz geograficznej. Skierowała uwagę na analizę chiralną, która opiera się na identyfikacji składu enancjomerycznego związków występujących w żywności. Wstęp zakończyła stwierdzeniem, że: „obecny stan wiedzy na temat autentyczności miodów

spadziowych z polskich pożytków pszczelich jest niedostateczny”. Zamieściła również cel pracy.

Rozdział 2 „Przegląd literatury” to 23 strony tekstu (13-35), na których Autorka przedstawiła przegląd literatury. Scharakteryzowała znaczenie chiralności w naturze. Zaprezentowała rodzaje izomerii. Wyszczególniła podstawowe założenia związane z chiralnością. Omówiła bioaktywność związków chiralnych na przykładzie leków, pestycydów, substancji zapachowych i składników odżywczych. Opisała również miód spadziowy i polski rynek miodu. W dalszej części omówiła metody oceny jakości miodów z podziałem na klasyczne i niekonwencjonalne. Ostatnią część przeglądu literatury stanowi analiza wykorzystania techniki chiralnej do oceny jakości miodów.

Rozdział 3 „Cel pracy” zamieszczony został na jednej 36-iej stronie. Autorka zamieściła tu sformułowaną hipotezę badawczą i przedstawiła zakres pracy obejmujący cztery etapy badań: wybranych parametrów fizykochemicznych, frakcji lotnych, wolnych aminokwasów i analizy chemometrycznej.

Rozdział 4 „Część doświadczalna” zawarty został na stronach 37-43. Autorka scharakteryzowała tutaj materiał wykorzystany do badań, metody badawcze oraz zamieściła podrozdział „4.3. Analiza statystyczna”.

Rozdział 5 „Omówienie i dyskusja wyników” stanowi główną część rozprawy i zawarty jest na 56 stronach (strony 44-100). Autorka prezentuje tutaj uzyskane wyniki badań parametrów fizykochemicznych (podrozdział 5.1.), chiralnych związków lotnych (podrozdział 5.2) i chiralnych wolnych aminokwasów (podrozdział 5.3.). W podrozdziałach 5.2. i 5.3. znalazły się wnioski chemometryczne oparte na analizie skupień (CA) i analizie składowych głównych (PCA).

Rozdział 6 „Stwierdzenia i wnioski” zawiera 3 strony (101 – 103) i obejmuje 10 stwierdzeń poczynionych przez autorkę na podstawie przeprowadzonych badań i dokonanych analiz chemometrycznych.

Rozdział 7 „Piśmiennictwo” zawarty na 17 stronach (104-120) wyszczególnia 182 pozycje literatury wykorzystane przez autorkę do redagowania pracy.

Dopełnieniem pracy jest: „Spis rysunków i tabel” (strony: 121-123), „Aneks” (strony 124-147) zawierający 9 tabel i jeden rysunek oraz „Wykaz osiągnięć naukowych” w postaci publikacji (6 pozycji), doniesień konferencyjnych (9 wystąpień w tym 4 na konferencjach międzynarodowych), odbyte staże, zrealizowane granty i uzyskane „dyplomy”.

Statystycznie około 40% pracy poświęcone jest studiom problemowym i przeglądowi literatury, a około 60% prezentacji metod badawczych i omówieniu wyników. Opracowanie zawiera szereg cennych i oryginalnych wyników badań a analizowany problem stanowi bardzo interesujące zagadnienie naukowe o ogromnym potencjale użytkowym. Chromatografia chiralna i zastosowana analiza chemometryczna stanowią nowoczesne metody badawcze wykorzystywane do szeroko rozumianej analizy żywności. Podjęty problem naukowy związany z próbą identyfikacji pochodzenia geograficznego miodów spadziowych z terenu Polski na podstawie identyfikacji związków chiralnych (lotnych i wolnych aminokwasów) stanowi ambitne zadanie badawcze.

Do znaczących osiągnięć uzyskanych przez doktorantkę w rozprawie, należy zaliczyć:

1. opanowanie warsztatu badawczego opartego na wykorzystaniu:
  - a) mikroekstrakcji HS-SPME i gazowej chromatografii chiralnej do identyfikacji związków lotnych;
  - b) cieczerwowej chromatografii chiralnej do identyfikacji wolnych aminokwasów;



- c) metod chemometrycznych opartych na analizie skupień (CA) i analizie składowych głównych (PCA);
2. wyznaczenie zawartości chiralnych związków lotnych w polskich miodach spadziowych;
3. przeprowadzenie szeroko rozumianego procesu analizy uzyskanych wyników z wykorzystaniem metod chemometrycznych.

Praca stanowi oryginalne opracowanie naukowe oparte na zaawansowanych technikach eksperymentalnych, które jednak nie dało jednoznacznego rozwiązania sformułowanego problemu naukowego.

Efekt końcowy realizacji pracy może być wynikiem popełniła przez autorkę szeregu błędów związanych zarówno z doбором materiału do badań, jak i przyjętych założeń badawczych. Poniżej zamieszczono uwagi krytyczne, które nasunęły się recenzentowi w trakcie analizy pracy. Zostały one podzielone na dwie grupy: uwagi krytyczne o charakterze merytorycznym oraz drobne zastrzeżenia szczegółowe związane głównie z redakcją i formatowaniem pracy.

### 3. Uwagi krytyczne o charakterze merytorycznym

Podstawowe zastrzeżenie merytoryczne związane z realizacją pracy dotyczy doboru materiału badawczego, czyli prób miodów spadziowych. Miód jest produktem stosunkowo zmiennym. Jego skład jest efektem szaty roślinnej, warunków pogodowych i stanu rodziny pszczoły. O ile miody spadziowe z terenów Polski południowej są wytwarzane głównie na bazie spadzi iglastej jodłowej (i skażane liściastą spadzią bukową), są charakterystyczne i łatwe w identyfikacji, to zbiór miodu spadziowego w rejonach centralnych i północno-wschodnich nie jest taki jednoznaczny. W rejonach tych miód ze spadzi iglastej praktycznie nie występuje (lub występuje wyjątkowo rzadko) a „spadziują” głównie drzewa liściaste. Przy czym spadź liściasta niekoniecznie może być surowcem przetwarzanym przez mszyce. Drzewa liściaste szczególnie w okresie upałów i niskiej wilgotności powietrza wydzielają eksudaty, które zabezpieczają je przed nadmierną stratą wody. Wydzieliny te stanowią roztwory cukrów i są również zbierane przez pszczoły jako surowiec miodowy. Doktorantka popełniła już w pierwszym zdaniu rozprawy poważny błąd związany z niewłaściwym zdefiniowaniem miodu spadziowego. Twierdzi: „Miód spadziowy to produkt wytworzony przez pszczoły ze spadzi, czyli z płynnej wydzieliny mszyc i innych owadów, które wysysają sok z liści i gałęzi roślin, przetwarzają go i pozostawiają lepka ciecz”. Nie poparła też tej definicji odniesieniem do dokumentu źródłowego. Tymczasem zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3.10.2003 roku „w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu” oraz Dyrektywą 2001/110/EC Unii Europejskiej z 20 grudnia 2001, miód to: „naturalny słodki produkt wytwarzany przez pszczoły *Apis mellifera* przez łączenie z własnymi specyficznymi substancjami nektaru roślin lub wydzielin żywych części roślin, lub wydalin owadów ssących żywe części roślin ...”. Tak więc do produkcji przez pszczoły miodu spadziowego są co najmniej dwa surowce: wydzieliny roślin i wydalin owadów ssących żywe części roślin. Jedne i drugie mogą pojawiać się na drzewach iglastych i drzewach liściastych (a nawet roślinach jednorocznych). Skład chemiczny wydzielin i wydalin jest różny. Należy więc oczekiwać, że i związki chiralne są różne. Należy przy tym jednoznacznie stwierdzić, że pszczelarz nie jest w stanie stwierdzić z czego pszczoły zebrały surowiec do wytworzenia miodu. Tak więc opieranie się na deklaracjach pszczelarzy jest błędne. Wiem to z autopsji albowiem od 40 lat prowadzę pasiekę.

Podstawowym wyróżnikiem charakteryzującym miód spadziowy jest przewodność elektryczna. Jest to parametr stosunkowo łatwy i szybki w pomiarze oraz powszechnie

wykorzystywany przy obrocie handlowym. Wysoka przewodność elektryczna powyżej 0,8 mS/cm (zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14.01.2009 (Dz. U. Nr 17, poz. 94 pkt. VII) jest podstawowym wyróżnikiem świadczącym, że mamy do czynienia z miodem spadziowym. Przy czym w zakresie przewodności od 0,8 do 0,95 mS/cm jest to zwykle miód ze spadzi liściastej a wartość powyżej 0,95 mS/cm świadczy, że jest to spadź iglasta. Przy wartościach przewodności elektrycznej od 0,4 do 0,8 mS/cm miód jest klasyfikowany jako nektarowo-spadziowy. Przy czym zwykle pomiar przewodności elektrycznej jest wspierany cechami organoleptycznymi takimi jak barwa, smak i zapach. Niestety spośród tych parametrów jedynie barwa była wykorzystana przez autorkę w prowadzonych analizach. Jest to zdecydowanie za mało, ażeby stwierdzić, że jest to miód spadziowy.

Reasumując trudno stwierdzić, czy miody wzięte do badań szczególnie z obszarów centralnej i północnej Polski były spadziowe!

Drugim zarzutem merytorycznym kierowanym do doktorantki jest lakoniczny opis stosowanych metod badawczych. Szczególnie dotyczy to podrozdziału „4.3. Analiza statystyczna”. Autorka jednym zdaniem skwitowała ten problem: „Wyniki analiz chromatograficznych poddano wielowymiarowym analizom statystycznym przy użyciu oprogramowania STATISTICA wersja 12.5 (StatSoft Polska)”. Zdanie to jedynie wskazuje jakie oprogramowanie wykorzystano w analizach, bez wskazania dokładniejszych danych o zastosowanych metodach. Tymczasem stosowane są zaawansowane techniki badawcze. Opisy metod badawczych pojawiają się przy prezentacji wyników badań i częściowo uzupełniają te braki. Niemniej opisy metod badawczych nie są precyzyjne.

#### **4. Uwagi o charakterze redakcyjnym**

W pracy zidentyfikowano niewielką ilość drobnych błędów, czy też nieporadności, które dotyczą formatowania, posługiwania się interpunkcją, tzw. literówki, błędy stylistyczne lub też inne nieścisłości związane z redagowaniem treści i opisem wyników. Ważniejsze z nich wyszczególniono poniżej:

1. We wstępie (na stronach 11 i 12) autorka zamieściła wiele „mocnych” sformułowań, które nie zostały poparte odniesieniem się do literatury źródłowej. Podobnie na stronie 26 zamieszczone jest zdanie: „Najwięcej wykrywanych zafałszowań w miodach krajowych dotyczy deklarowanego pochodzenia botanicznego i geograficznego”. Recenzent nie polemizuje z tym stwierdzeniem, niemniej ze względu na jego znaczenie przy realizacji pracy wskazane jest odniesienie się do źródła.
2. Na stronie 33 znajduje się zdanie: „W kolejnym doświadczeniu [Bruckner i in. 1995] przy użyciu HPLC z kolumną achiralną (Hawkklett Pacard, UK) analizowane były uprzednio zreprzywatyzowane próbki żywności (w tym miodów).” Występuje tu szereg błędów stylistycznych, błędny sposób odwołania się do źródła oraz błąd wprowadzony przez automatyczny edytor tekstu. Błąd ten wynikł najprawdopodobniej z faktu, że w słowniku edytora nie było słowa derywatyzowane, co zostało poprawione automatycznie przez Edytor na zreprzywatyzowane. Należy bardzo uważać przy posługiwaniu się bardzo rzadkimi i fachowymi sformułowaniami.
3. W prezentowaniu wyników badań autorka na wstępie prawie we wszystkich przypadkach zamieściła opisy metod badawczych, które powinny być w metodyce.



4. Opis rysunków jest mało czytelny i nie wyróżnia się z tekstu np. str. 77 i 78. Trudno stwierdzić, czy jest to tekst czy opis rysunku?
5. Trudno zgodzić się ze stwierdzeniem nr 1 zamieszczonym w rozdziale 6. Z wyników badań nie wynika jednoznacznie, że poprowadzone badania pozwalają jednoznacznie zidentyfikować miód ze względu na pochodzenie geograficzne. Niemniej dostarczają wielu cennych dodatkowych informacji o autentyczności pożytków pszczelich.

#### **5. Analiza dorobku naukowego mgr inż. Pauli Kuźmy**

Analiza dorobku doktoranta nie jest obligatoryjnie wymagana. Niemniej jest wymiennikiem aktywności naukowej oraz wagi podejmowanych problemów badawczych. Mgr inż. Paula Kuźma jest autorką 6 publikacji w tym dwóch z *Impact Factorem*. Wszystkie publikacje są punktowane zgodnie z wytycznymi MNiSW powyżej 10 pkt. Przy czym w dwóch publikacjach jest pierwszym autorem. Uczestniczyła w 9 konferencjach naukowych w tym 5 międzynarodowych. Ma odbyte trzy staże zagraniczne oraz była kierownikiem projektu wewnętrznego SGGW w 2015 roku.

Dorobek publikacyjny jednoznacznie wskazuje, że autorka rozprawy doktorskiej jest aktywnym pracownikiem naukowym, podejmującym istotne zagadnienia naukowe i realizującym badania na wysokim poziomie naukowym.

#### **4. Wnioski końcowe**

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska pt. „Wykorzystanie chiralnej chromatografii do oceny jakości miodów spadziowych” autorstwa Pani mgr inż. Pauli Kuźmy jest oryginalnym opracowaniem aktualnego problemu naukowego w oparciu o zaawansowane techniki badawcze o dużym znaczeniu dla nauki i praktyki związanej z oceną jakości żywności. Autorka pracy wykazała się wiedzą teoretyczną oraz umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Praca opiera się na obszernym materiale źródłowym związanym z tematyką pracy. Pomimo uwag krytycznych związanych głównie z potknięciami związanymi z doбором parametrów fizykochemicznych do identyfikacji materiału badawczego, drobnymi uwagami związanymi ze stroną redakcyjną opracowania należy uznać, że jej struktura jest właściwa a autorka sprostała zadaniu napisania rozprawy w sposób poprawny i zwięzły. Autorka wykazała się znajomością wiedzy ogólnej i szczegółowej z analizowanego zagadnienia. Można więc przyjąć, że spełniony został warunek podstawowy dla rozpraw doktorskich zgodnie z art.13.ust.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 roku „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595. ( z póź. nowelizacjami z dn. 18 marca 2011 roku). Jednocześnie należy stwierdzić, że praca przygotowana przez Panią mgr inż. Paulę Kuźmę zawiera wiele nowych cennych informacji, które w przyszłości będą mogły być wykorzystane do dogłębnej analizy zagadnienia związanego z oceną jakości miodów spadziowych. Autorka pomimo drobnych potknięć opanowała posługiwanie się złożonymi technikami badawczymi w szerokim zakresie oraz zaawansowanymi analizami statystycznymi. Wyniki badań stanowią cenną wiedzę odkrywającą nowe obszary do badania jakości i pochodzenia miodu.

**Wnoszę więc o dopuszczenie rozprawy do publicznej obrony.**

