

Prof. dr hab. Erwin Wąsowicz
Zakład Żywności i Żywienia
Akademii Wychowania Fizycznego
Im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauli Kuźmy, pt. „Wykorzystanie chiralnej chromatografii do oceny jakości miodów spadziowych” wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Mieczysława Obiedzińskiego na Wydziale Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Autentyczność botaniczna i geograficzna stanowią istotne kryteria zapewnienia jakości żywności. Metody oceny jakości i autentyczności produktów spożywczych to zagadnienia ważne dla organów kontrolujących, producentów i dystrybutorów żywności. Coraz większa świadomość rosnącej skali zafalszowań miodów spowodowała wzrost zainteresowania opracowaniem nowych, dokładniejszych metod kontroli autentyczności. Obserwując literaturę światową dotyczącą szeroko pojętego obszaru metod analitycznych stosowanych do kontroli jakości żywności daje się zauważyć wykorzystanie w coraz większym stopniu metod instrumentalnych opartych na analizie chromatograficznej. W metodach tych zazwyczaj oznacza się wybrane markery będące wskaźnikiem autentyczności, które analizowane są następnie za pomocą technik chemometrycznych. Wykorzystanie chemometrii w interpretacji danych chromatograficznych jest kierunkiem o coraz większym znaczeniu w chemii analitycznej i analityce żywności.

Problematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauli Kuźmy dotyczy oceny możliwości zastosowania technik instrumentalnych i chemometrycznych, opartych na gazowej i cieczowej chromatografii chiralnej do określenia autentyczności i pochodzenia geograficznego miodów spadziowych. Należy podkreślić, że chromatografia chiralna dostarcza bardziej szczegółowych informacji na temat składu badanej próbki, niż standardowe metody stosowane w analizie żywności. W światowej literaturze brak jest danych na temat kompleksowej analizy składników chiralnych w miodach spadziowych. Tematyka pracy jest więc aktualna z poznawczego punktu widzenia i ważna ze względu na duże znaczenie praktyczne.

Oceniana praca mgr Pauli Kuźmy nie odbiega pod względem formalnym od schematu przyjętego dla prac doktorskich. Układ jest właściwy dla przyrodniczych prac analitycznych. Praca obejmuje 123 strony maszynopisu, w tym 11 tabel i 44 rysunki (Aneks 9 tabel i 1 rysunek). Cytowane są 182 pozycje literatury.

Dysertacja składa się z 6 głównych rozdziałów oraz aneksu. Napisana jest w sposób jasny i zrozumiały. Na podkreślenie zasługuje zwięzłość i walory estetyczne dokumentacji. Wyniki są oryginalne, opracowane z zastosowaniem odpowiednich metod badawczych.

Przegląd literatury stanowi bardzo skondensowane, ale przejrzyste wielowątkowe opracowanie, doskonale wprowadzające w liczne poruszane w pracy zagadnienia. Rozpoczyna się omówieniem znaczenia chiralności w przyrodzie, z ujęciem rysu historycznego, budowy enancjomerów oraz bioaktywności związków chiralnych (leki, pestycydy, substancje zapachowe). Następnie zwięźle przedstawiono literaturę na temat charakterystyki spadzi i miodu spadziowego. Autorka bardzo dobrze wprowadza czytelnika w część doświadczalną pracy w podrozdziale na temat jakości i autentyczności miodów, w którym omówiono sposoby fałszowania miodów, klasyczne metody oceny jakości miodów oraz liczne instrumentalne metody oceny jakości miodów i ich zafałszowań. Część literaturową kończy podrozdział techniki chiralne w analizie żywności, w tym zasady rozdziałów chiralnych i przykłady zastosowań analiz chiralnych do oceny jakości miodów. Poszczególne części tworzą logiczną i przejrzystą całość, stanowiąc bardzo dobrą podstawę do sprecyzowania celu pracy.

Autorka do osiągnięcia nadrzędnego celu pracy podjęła się wykonania czterech następujących zadań:

1. Badanie wybranych parametrów fizykochemicznych miodów spadziowych
2. Badanie frakcji lotnej miodów przy użyciu HS-SPME-GC-MS
3. Badanie wolnych aminokwasów przy użyciu HPLC-UV/VIS
4. Analiza chemometryczna wyników

W części doświadczalnej scharakteryzowano materiał badawczy oraz omówiono metody badań. Badania przeprowadzono na 21 próbach miodów ze spadzi iglastej z pasiek z wybranych rejonów Polski. Pochodzenie botaniczne i geograficzne miodów zostało zagwarantowane poprzez deklarację pszczelarzy (słaby punkt badań). W pracy nie podano roku i sezonu dostarczenia próbek miodów spadziowych. W trakcie realizacji pracy badano parametry fizykochemiczne miodów, takie jak zawartość wody (metoda refraktometryczna), pH i barwę metodą spektrofotometryczną. Związki lotne izolowano metodą mikroekstrakcji do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME) z optymalizacją wybranych parametrów metodą Taguchi.

Związki lotne analizowano techniką GC-MS z zastosowaniem kolumny kapilarnej z fazą chiralną. Identyfikacji związków dokonano poprawnie przez porównanie indeksów retencji, widm masowych z danymi wzorców lub danymi literaturowymi. Do ilościowej interpretacji wyników analizy związków lotnych wykorzystano iloraz pola powierzchni pod pikami zidentyfikowanych związków przez pole powierzchni pod pikiem standardu zewnętrznego benzofenonu.

Wolne aminokwasy po ich derywatywacji oznaczono techniką HPLC z detektorem diodowym DAD-UV/VIS. Należy zaznaczyć, że Kandydatka opracowała parametry rozdziału eksperymentalnie.

Dobór metod nie budzi zastrzeżeń, zastosowano bardzo nowoczesne i wiarygodne techniki, umożliwiające osiągnięcie zamierzonego celu.

Wyniki i dyskusję przedstawiono na 57 stronach, w tekście umieszczono 6 czytelnych tabel i 36 rycin, co ułatwia analizę omawianego materiału. Ponadto w aneksie przedstawiono 9 tabel głównie z wynikami bezpośrednich pomiarów.

Na początku Autorka przedstawiła wyniki analiz fizykochemicznych badanych miodów spadziowych. Wykazała, że zawartość wody, pH i barwa są istotnym wskaźnikiem jakości i warunków przechowywania miodu i nie mogą stanowić wyróżników pochodzenia geograficznego ani botanicznego.

Ważnym osiągnięciem metodycznym pracy była optymalizacja parametrów analiz profili związków lotnych techniką HS-SPME-GC/MS. W wyniku tej optymalizacji ustalono rodzaj włókna, czas inkubacji, czas ekspozycji włókna i temperaturę dozownika.

Opracowana i zoptymalizowana procedura analityczna pozwoliła na rozdział i identyfikację 106 składników związków lotnych w badanych miodach spadziowych. We frakcji nadpowierzchniowej badanych miodów zidentyfikowano 16 aldehydów, 32 izoprenoidów, 8 pochodnych furanu, 16 alkoholi, 7 ketonów, 3 estry, 7 węglowodorów alifatycznych, 8 kwasów karboksylowych i 8 innych związków. Wśród zidentyfikowanych związków 29 składników wykrytych zostało we wszystkich badanych miodach.

Wyniki wskazały, że analizowane frakcje lotne miodów spadziowych z pożytków zlokalizowanych w różnych rejonach Polski były zbliżone pod względem jakościowym, ale różnicowały je ilościowe zależności pomiędzy komponentami. Nowatorski aspekt pracy wiąże się z rozdziałem, identyfikacją oraz analizą ilościową 10 par enancjomerów terpenowych we frakcji lotnej miodów spadziowych. Po raz pierwszy przedstawiono ułamek enancjomeryczny (EF) komponentów chiralnych w miodach spadziowych. Wykazano m.in., że R-(+)-limonen występował jako dominujący z pary enancjomerów. Także trans(-)-tlenek linalolu był dominującym enancjomerem. Wiadomo, że

koncentracja i wzajemne proporcje par enancjomerów związków terpenowych w miodach determinowane są przez czynniki środowiskowe, klimatyczne i botaniczne.

W wyniku przeprowadzonej analizy skupień (CA) chiralnych związków lotnych otrzymano skupienie odzwierciedlające położenie geograficzne miodów z północy Polski i z południa Polski. Prawdopodobnie miody z rejonów południowych pochodziły głównie ze spadzi jodłowej, zaś miody z rejonów północnych z innych typów spadzi. Należy podkreślić, że przeprowadzona analiza statystyczna związków lotnych ogółem nie pozwoliła na pogrupowanie miodów w żadne rejony geograficzne.

Analiza statystyczna w oparciu o analizę składowych głównych (PCA) wykazała także przydatność do zróżnicowania prób miodów spadziowych pod względem lokalizacji geograficznej.

Kandydatka na podstawie profili chiralnych związków lotnych w połączeniu z technikami chemometrycznymi wytypowała 5 komponentów chiralnych jako markery polskich miodów spadziowych. Markery te mogą być przydatnym narzędziem do identyfikacji pochodzenia geograficznego miodów spadziowych ze spadzi iglastej z północnych i południowych rejonów Polski oraz wnioskowanie o autentyczności pożytków miodowych.

Druga część pracy eksperymentalnej poświęcona była wolnym aminokwasom. Zastosowana w pracy procedura analityczna umożliwiła rozdział, analizę jakościową i ilościową 19 wolnych aminokwasów. W badanych miodach spadziowych sumaryczna zawartość wolnych aminokwasów w badanych miodach wynosiła od 977,22 do 1754,67 mg/kg. Skład aminokwasowy miodów z pożytków spadziowych cechował się dużą zmiennością. Dominującym aminokwasem w każdej z badanych prób była prolina. Wszystkie oznaczone aminokwasy występowały w formie L-aminokwasów (z wyjątkiem achiralnej glicyny). Ponadto dla czterech aminokwasów: fenyloalaniny, proliny, tyrozyny, alaniny oznaczono izomery w konfiguracji D. Izomery D-aminokwasów zostały wykryte tylko dla związków oznaczonych w największej koncentracji w badanych próbach. Autorka nie wyklucza, że pozostałe D-aminokwasy również były obecne w próbach w ilościach poniżej granicy wykrywalności.

W pracy nie wykazano przydatności profili chiralnych aminokwasów w połączeniu z analizą chemometryczną do różnicowania miodów pod względem lokalizacji pożytków spadziowych. Wskazano jedynie na 5 aminokwasów, które mają największy potencjał w różnicowaniu badanych miodów na podstawie lokalizacji geograficznej pożytków spadziowych. Obecność form enancjomerycznych D wśród związków różnicujących badane miody spadziowe pod kątem pochodzenia geograficznego świadczy o istotnej roli tych aminokwasów w ocenie autentyczności miodów.

Na zakończenie pracy Autorka przedstawiła 10 stwierdzeń i wniosków. Jestem zwolennikiem przedstawiania w zakończeniu pracy tylko wniosków wynikających z badań przedstawionych w pracy. Taki warunek spełniają punkty 1,2,3,4,8,9,10 z kolei 3,5,6 i 7 winny być zawarte w dyskusji.

Zauważone błędy komputerowe i redakcyjne:

s. 17, błąd w zdaniu. Dla przykładu, oba enancjomery karwonu mają identyczną temperaturę topnienia 231° oraz identyczną temperaturę wrzenia 25°

s. 59, błąd w zdaniu Obecność rozgałęzionych aldehydów tj. 2,4-pentadienal....


Tabela 7, niezgodne dane liczbowe dla następujących związków: ester metylowy kwasu fenylloctowego, karwatanacetonu, kwas cytronelowy, 4,7-dimetylobenzofuranu, pentadekan

S.84 Chmiel i in. (2013), brak w spisie literatury

Ocena końcowa

Uważam, że oceniana praca dokumentuje szeroką wiedzę Doktorantki, znakomite opanowanie przez Nią warsztatu naukowego oraz umiejętności łączenia badań poznawczych i aplikacyjnych. Praca wnosi wiele nowości naukowych. Za szczególne osiągnięcie rozprawy uważam wykorzystanie w jednym opracowaniu metod chemometrycznych do obróbki danych chromatograficznych zarówno chiralnych związków lotnych, jak i aminokwasów. Na podkreślenie zasługuje również rzetelny warsztat analityczny kandydatki.

W świetle przedstawionej bardzo pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że praca ta zarówno pod względem wartości merytorycznej uzyskanych wyników, jak i ich sposobu prezentacji spełnia wymogi ustawy o stopniach naukowych stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie pani mgr inż. Pauli Kuźmy do dalszych etapów ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.


prof. dr hab. Erwin Wąsowicz