

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Marzeny Pabich p.t.
„Związki bioaktywne w ekstraktach z soi, właściwości żywieniowe i prozdrowotne”

Rozprawa została wykonana na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, pod promotorstwem Pani dr hab. Małgorzaty Materskiej, profesor uczelni, z udziałem Pani promotor pomocniczej dr Małgorzaty Kosteckiej.

Formalna ocena pracy

Praca liczy 139 stron i jest podzielona na 6 podstawowych rozdziałów: wstęp, przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody badań, wyniki badań i dyskusja oraz podsumowanie i wnioski. Dodatkowo rozprawa zawiera bibliografię, streszczenie, summary, spis tabel i spis rysunków. Formalny układ rozprawy jest więc typowy dla tego typu prac.

Merytoryczna ocena założeń rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr Marzeny Pabich dotyczy niezwykle ważnego, aktualnego i bardzo polskiego tematu jakości i wartości soi uprawianej w Polsce. Jak powszechnie wiadomo soja jest niebywale wartościową rośliną uprawianą w zasadzie na całym świecie, gdzie istnieją odpowiednie warunki klimatyczno-glebowe. Nasiona soi to najlepsze źródło białka roślinnego, zarówno pod względem ilościowym (powyżej 40% białka), jak i jakościowym. Dodatkowo zawiera wartościowy olej, szczególnie w zakresie obecności kwasu alfa-linolenowego z grupy kwasów omega-3 (deficytowej w Polsce) oraz innych fitozwiązków m.in. izoflawonów o potwierdzonych i potencjalnych właściwościach prozdrowotnych. Ostatnie lata to w pewnym sensie rozkwit produkcji soi w Polsce. Stało się to możliwe dzięki opracowaniu nowych odmian soi oraz – zapewne – ociepleniu klimatu w Polsce. Niestety jakość uprawianej w Polsce soi nie jest najlepszej jakości. (Z prywatnej rozmowy z czołowym producentem tofu w Polsce wiem, że próbował stosować polską soję, ale niestety bez powodzenia ze względu na nieodpowiednią jakość nasion a według tego

producenta z powodu szczególnie niskiej zawartości i jakości białka). I tu nasuwają się pewna wątpliwości: dlaczego w tytule rozprawy nie ma niezwykle ważnej informacji, że badania dotyczą wyłącznie odmian uprawianych w Polsce?

Badaniom poddano nasiona aż 12 odmian soi aktualnie zarejestrowanych w Polsce, dodatkowo przeprowadzono te badania na dojrzałych i niedojrzałych nasionach. Ponadto przebadano skład i jakość liści i strączyń wybranych odmian, co znakomicie rozszerza zakres badań. A zakres ten jest niezwykle bogaty i wartościowy i obejmuje m.in. szczegółowy skład chemiczny ale również aktywność antyoksydacyjną, wpływ rodzaju rozpuszczalnika na jakość ekstraktów, hamowanie aktywności enzymów trawiennych a nawet właściwości antynowotworowe ekstraktów, również frakcji ze strączyń.

Zatem tematyka i założony zakres badań muszą być ocenione bardzo wysoko, szczególnie z powodu bogatego materiału badawczego i niezwykle szerokiego zakresu badań, tym bardziej że tego typu badania mają charakter pionierski.

Szczegółowa ocena rozprawy

1. Przegląd literatury

Przegląd literatury liczy 26 stron i składa się z 7 podrozdziałów, w tym 6 z nich

dotyczy składu nasion soi (soja jako źródło związków aktywnych, skład chemiczny i wartość żywieniowa nasion soi, izoflawony, białko, tłuszcze, substancje antyżywniowe oraz zawartość związków bioaktywnych w pozostałych częściach anatomicznych soi), a jeden z podrozdziałów przynosi opis korzyści zdrowotnych wynikających ze spożywania nasion soi i jej produktów. Interesujące, że Autorka umieszcza w spisie składników na pierwszym miejscu izoflawony (2.1.1.1) a na drugim białko (2.1.1.2). Interesujące gdyż na ogół białko występuje zawsze na pierwszym miejscu z racji największej zawartości i dodatkowo potwierdzonym przez amerykańską Food and Drug Administration oświadczeniem zdrowotnym dotyczącym możliwości obniżania ryzyka chorób serca, o czym zresztą Autorka bardzo słusznie pisze w Przeglądzie. Natomiast niezbyt jasno pisze o często występujących w literaturze informacjach o synergistycznym oddziaływaniu izoflawonów i białek sojowych, nawet w izolatach białkowych, gdzie izoflawonów są jedynie śladowe ilości.

Z racji wyjątkowego naukowego zainteresowania tłuszczami pozwolę sobie na dwie uwagi. Po pierwsze – uwaga do stwierdzenia, że olej sojowy cechuje się wysoką wartością dietetyczną ze względu na korzystny stosunek kwasów tłuszczowych SFA:MUFA:PUFA. To oczywiście prawda, ale dziś już niepełna. Albowiem aktualnie, szczególnie w Polsce spożywa się za dużo kwasów omega-6 a za mało kwasów omega-3, a to jest sytuacja bardzo niebezpieczna zdrowotnie, bo może generować stany zapalne a w efekcie nawet mówi się o zmianach nowotworowych. Już wiele lat temu przedstawiono szczegółowo ten problem m.in. w referacie plenarnym na Europejskim Kongresie Lipidowym w 2012 roku w Krakowie.

Dlatego powinno się, szczególnie w Polsce, baczniej zwracać na ten fakt uwagę. Autorka w dalszej części Przeglądu o tym lekko wspomina ale bez tej kropki nad i. I po drugie – zupełnie niezrozumiałe jest stwierdzenie, że produktami bogatymi w kwas alfa-linolenowy (ALA) są oleje...”wytłaczane i stosowane wyłącznie na zimno”. Jest to opinia podwójnie nieprawdziwa, albowiem oleje rafinowane też zawierają kwas alfa-linolenowy, choć faktem jest, że z nieco niższą (rzędu 1 punktu procentowego) zawartością tego kwasu. Również podczas technologicznych czy kulinarnych procesów termicznych straty kwasu ALA są bardzo małe. Przykładowo w sterylizowanych rybach w puszkach jest rzędu kilku procent, podobnie podczas jednorazowego smażenia. Ale rzecz jasna uwaga ta dotyczy głównie autorów publikacji cytowanej w rozprawie.

Ogólnie przegląd jest bogaty, zasadniczo zawiera wszystkie niezbędne informacje dotyczące tematyki rozprawy doktorskiej. Szczególnie obszerny jest podrozdział dotyczący korzyści zdrowotnych wynikających ze spożywania soi i jej produktów. Wyjątkowo szczegółowo omówiono wpływ soi na różne choroby, m.in. cukrzycę typu II, osteoporozę, nowotwory i choroby układu sercowo-naczyniowego. Te informacje wyraźnie wskazują na bardzo duży potencjalny wpływ prozdrowotny składników soi, nie tylko nasion, ale i np. liści. To również silnie potwierdza podjęcie badań na ten temat.

2. Cel pracy

Cel pracy sformułowany dość oszczędnie w słowach ale zasadniczo prawidłowo, w sposób jednoznaczny i pełny opisujący zamierzenia i oczekiwania badawcze.

3. Materiał i metody badań

Ta część rozprawy jest mocno szczegółowa, zawiera się aż w 32 (wobec 20 w części wynikowej) podrozdziałach. Wynika to przede wszystkim z bardzo szerokiego zakresu badań dotyczącego nasion soi i badań porównawczych ich odmian m.in.: zawartość wody, białka, tłuszczu i składu kwasów tłuszczowych, zawartości związków fenolowych i flawonoidów oraz aktywności antyoksydacyjnej. Drugą częścią tej metodyki to – jak to określa Autorka – „Analiza fitochemiczna suchych ekstraktów nasion soi” obejmująca oznaczenie zawartości polifenoli oraz aktywności antyoksydacyjnej oraz hamowanie aktywności enzymatycznej alfa-amylazy, alfa-glukozydazy i lipazy. Kolejny duży pakiet analityczny dotyczy analizy porównawczej ekstraktów z nasion, liści i strączyń soi odmiany Aldana w zakresie podobnym do opisanej wyżej analizy fitochemicznej nasion 12 odmian soi. Dodatkowym i niezwykle interesującym uzupełnieniem tych badań stanowiła metodyka oznaczania aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek raka jelita grubego, prostaty oraz komórek prawidłowych. Opis metodyki kończy część statystyczna. Rozdział zamyka wykaz najważniejszych odczynników oraz aparatury i sprzętu.

Jak wspomniano na wstępie opisy procedur przygotowawczych o analitycznych są bardzo szczegółowe i zasadniczo trudno mieć wątpliwości. Natomiast można mieć kilka uwag o charakterze, nazwijmy to, porządkowym. Przede wszystkim w stosunku do opisu materiału badawczego, tzn. 12 badanych odmian soi. Podano mianowicie kiedy zostały zarejestrowane i przez kogo, natomiast nie podano ani słowa czym się te odmiany różnią. A można przypuszczać, że się różnią choćby kolorem, co niekiedy bywa przyczyną różnic w ich składzie. I druga uwaga, wydaje się jeszcze ważniejsza, bo dotyczące podanej informacji, że badano również „nasiona niedojrzałe”. Natomiast nie sprecyzowano co to znaczy, a przecież wiadomo, że ostatni okres dojrzewania jest krytyczny dla końcowej jakości i składu. Należało bez wątpienia podać na ile dni przed końcowym zbiorem były pozyskiwane.

I jeszcze kilka następnych uwag porządkowych, choć ważnych w części metodycznej: nie podano na jakiej podstawie dokonano wyboru trzech zastosowanych rozpuszczalników. Czy to układy ekstrakcyjne stosowane przez innych autorów (jakich?) czy wynik własnych badań. Dalej też nie wszędzie podano źródło metodyki np. „Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej metodą z rodnikiem DPPH”, a w metodzie z kationorodnikiem ABTS podano źródło ale z informacją, że „z pewnymi modyfikacjami”, nie podając czego one dotyczyły (s. 39); dalej „Analiza chromatograficzna profili izoflawonów w nasionach soi” (s. 40) i również na tej stronie tabela 4 także bez autora; również „Przygotowanie ekstraktów do badań” i „Hodowla komórek nowotworowych” nie mają źródła (s. 44). I jeszcze drobna uwaga do metody chromatograficznej składu kwasów tłuszczowych. Autorka podała źródło metodyki, ale zwyczajowo podaje się jeszcze szczegóły np. typ chromatografu, opis stosowanej kolumny, gazy, temperatury. Chromatograf gazowy również nie znalazł się w spisie aparatury.

Podsumowując stwierdzam, że materiał badawczy jest bardzo szeroki i – zasadniczo – bezbłędny. Metodyka jest niezwykle bogata, szeroka i opisana w sposób bardzo szczegółowy. Oznacza to bardzo pozytywną ocenę tej części rozprawy Pani mgr Marzeny Pabich.

4. Wyniki badań i dyskusja

Wyniki podstawowego składu odmian nasion soi zarejestrowanych w Polsce charakteryzują się podobną zawartością podstawowych składników: białka, tłuszczu i poszczególnych kwasów tłuszczowych. Zawartość białka jest generalnie niska, tylko jedna odmiana wykazała zawartość białka powyżej 40% (Paradis 42,63%). Białko, co oczywiste, to główny składnik nasion soi, najważniejszy z punktu widzenia użytkowego. Zawartość tłuszczu w nasionach soi wahała się w stosunkowo wąskich granicach od 17,95% do 21,91%, podobnie zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych była zbliżona, przykładowo najmniej korzystny zdrowotnie kwas palmitynowy od 10,13 do 11,89%, a najkorzystniejszy kwas alfa-linolenowy od 7,33% do 9,70%.

Zawartość związków fenolowych mieściła się w przedziale od 2,24 do 3,31 mg kw. galusowego na gram s.m. Natomiast zawartość flawonoidów zawierała się w szerszych granicach od 1,15 do 2,15 mg kwercetyny na gram s.m. Rozbieżności są więc duże, przy czym ma na to wpływ jedna odmiana: GL Melanie o zdecydowanie najwyższej zawartości obu tych składników.

Aktywność antyoksydacyjna badanych 12 odmian nasion soi też była dość zróżnicowana, szczególnie w przypadku metody z użyciem wolnego rodnika DPPH: od 4,64 do 8,22 uMol TE/g.s.m. W przypadku ABTS różnice te były znacznie mniejsze: od 12,14 do 15,19. Ciekawa jest podana przez Autorkę w tej części pracy informacja, że potencjał redukujący aktywność DPPH i ABTS zależy od barwy nasion. Najwyższy potencjał antyoksydacyjny wykazują nasiona czarnej soi, a najniższy nasiona żółtej soi. Czy w przypadku badanych nasion soi, o których barwie nie ma informacji, występuje też taka zależność?

Badania zawartości izoflawonów wykazało bardzo duże różnice odmianowe: od 1866 do 4207, przy zawartości średniej 2960 ug/g s.m. nasion. Podobnie wysokie były różnice poszczególnych grup izoflawonów, przy czym procentowe zawartości beta-glikozydów dominowały stanowiąc praktycznie równo połowę (50,06%) wszystkich, wahając się we względnie niewielkich granicach od 47,00 do 56,68%. Odmianami, które okazały się najbogatsze w izoflawony okazały się GL-Melanie, Madlen oraz Petrina. Najwięcej genisteiny, czyli najbardziej aktywnego fitoestrogenu zawierały odmiany wymienione również wyżej, a mianowicie GL-Melanie i Petrina.

Podsumowując tę część badań Pani mgr Marzeny Pabich należy ją ocenić bardzo wysoko, ze względu na szerokość zakresu badań i – co należy podkreślić raz jeszcze – bardzo szeroki zakres surowców do badań, wszystkich dwunastu zarejestrowanych odmian soi w Polsce. Jak wykazano zawartość poszczególnych składników badanych odmian nasion soi jest zróżnicowana, niekiedy bardzo wyraźnie np. cennych zdrowotnie izoflawonów. Tego typu informacje są niezwykle cenne z punktu widzenia możliwości przyszłego ukierunkowania aplikacyjnego. Ciekawa jest również konkluzja, że aktywność antyoksydacyjna nie była związana z obecnymi w nasionach soi flawonoidami, co oznacza silne oddziaływanie antyoksydacyjne innych niż fenolowe składników nasion.

W dalszej części rozprawy doktorskiej Pani mgr Marzeny Pabich podano wyniki nad ekstraktami z nasion 12 odmian soi. Przeprowadzono badania dotyczące optymalizacji stosowanych układów ekstrakcyjnych pod kątem ich wydajności, zawartości związków fenolowych oraz właściwości przeciwutleniających ekstraktów suchych, hamowania aktywności enzymów trawiennych: alfa-amylazy, alfa-glukozydazy oraz lipazy. Ta część rozprawy jest również niezwykle bogata, ze znakomitą liczbą wielce interesujących wyników. Ogółem przebadano trzy układy ekstrakcyjne: woda, 1%HCOOH oraz 80% EtOH.

Uzyskane wyniki są bardzo interesujące i bardzo zróżnicowane, co istotnie wzbogaca wiedzę z tej dziedziny. Tym bardziej, że cała mapa otrzymanych wyników to materiał do niemal wieloletnich dywagacji naukowych, albowiem to jest ogrom wyników, mnóstwo różnic i ogromne pole do naukowych interpretacji. Trudno omówić tę masę wyników, w tym np. różnice w aktywności przeciwutleniającej 12 odmian, 3 układów rozpuszczalników i wyniki są tak rozbieżne i zawierające się między 0,590 a 11,451 mg/cm⁻³; podobnie kształtują się wyniki oceniające hamowanie aktywności lipazy, które różnią się pomiędzy „brak aktywności” a aktywnością od 0,240 do 12,950. To są dwa przykłady spośród setek wyników. Naukowe ogarnięcie tego problemu to zajęcie na kolejny a może i kolejne doktoraty! Autorka bardzo ambitnie próbuje to rozwikłać powołując się na wiele źródeł literaturowych i trzeba to bardzo docenić. Nachylenie prozdrowotne powoduje, że Autorka wprowadza dodatkowo do tej dyskusji aspekty zdrowotne, dietetyczne czy aktywność fizyczną. Na pewno są to istotne czynniki i ambitne próby, ale stwarzają pewien rodzaj odejścia od głównego tematu. Te bardzo pozytywne i skądinąd bardzo wartościowe głębokie poszukiwania możliwych oddziaływań, są – niejako siłą rzeczy – nieco chaotyczne, gdyż pojawiają się fragmenty tzw. wszytkoizmu. Autorka gromadzi wszystkie możliwe znalezione źródła naukowe i wprowadza do dyskusji, choć niekiedy nie mają związku z aktualnie dyskutowaną materią. Przykładem są rozważania nad soją fermentowaną, co oczywiście na pewno ma wpływ na badane zjawiska, ale nie jest to tematem rozprawy. Natomiast jeśli wynika, że może mieć drastycznie pozytywny wpływ, to taki wniosek winien znaleźć się w konkluzji. Ale podkreślam: ta część rozprawy jest niezwykle bogata, zróżnicowana i o ogromnej wartości naukowej.

Badania nad wartością odżywczą nasion soi o różnym stopniu dojrzałości oceniam umiarkowanie pozytywnie, albowiem nasiona niedojrzałe, jak sama nazwa wskazuje, nie są odpowiednie do zbioru. Przede wszystkim w przypadku nasion oleistych występuje zasadniczo dyskwalifikujące zjawisko bardzo wysokiej liczby kwasowej oleju. Wolne kwasy tłuszczowe, których może być kilka-nawet kilkanaście procent w sposób zdecydowany obniżają wydajność oleju. Tak więc zaproponowany wniosek, że „niedojrzałe nasiona soi mogą stanowić cenne źródło cennego oleinowego...” jest mocno przesadzone. Zresztą wystarczy spojrzeć w historię uprawy soi w Polsce: nie była uprawiana, bo nie miała warunków aby dojrzeć!

Natomiast bardzo interesujące są badania nad jakością a szczególnie zawartością związków fenolowych oraz flawonoidów w liściach i strączkach, ale też wydaje się, że jedynie w stanie „jadalnej zieloności” tzn. spożywanej podobnie jak strączki zielonego groszku. To jednak nie zostało opisane. Potwierdzają to wyniki badań, które wykazują, że w porównaniu z nasionami liście zawierają kilka razy więcej związków fenolowych i aż kilkadziesiąt razy więcej flawonoidów. To wyniki niezwykle interesujące i – znów – warte głębokiego przeanalizowania, tym bardziej, że potwierdzają badania innych autorów, więc wydają się potwierdzone. Tym bardziej, że stwierdzona aktywność antyoksydacyjna liści jest również wyższa, aczkolwiek w znacznie mniejszym stopniu. Zawartość oraz profil

izoflawonów był najwyższy w nasionach, ale przy bardzo dużym zróżnicowaniu jakościowym. Te badania zostały potwierdzone badaniami ekstraktów z tych surowców: ekstrakty z liści, niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika, wykazywały znacznie większą (3-4 razy więcej) zawartość związków fenolowych niż w nasionach czy strączynach. Natomiast interesujące, że nie przekłada się to na aktywność antyoksydacyjną, która jest znacznie silniejsza w ekstraktach z nasion niż liści, przy czym różnica ta jest szczególnie wyraźna w przypadku metody z DPPH i też bez względu na zastosowany rozpuszczalnik. Natomiast zupełnie inaczej przedstawia się wpływ na hamowanie aktywności enzymów, przy czym dotyczy to nie tylko porównanie nasiona-liście, ale również bardzo duże pomiędzy poszczególnymi enzymami (alfa-amylaza, alfa-glukozydaza i lipaza) i pomiędzy poszczególnymi rozpuszczalnikami.

Ostatnim elementem rozprawy są ambitne i dotyczą właściwości przeciwnowotworowych ekstraktu oraz frakcji ze strączyn soi. Nie trzeba udowadniać wagi tego typu badań. Przedstawione wyniki są niezwykle interesujące i optymistyczne. Wykazano m.in. że ekstrakt etanolowy oraz frakcja wodno-metanolowa hamowały wzrost komórek raka prostaty. Wniosek ten jest bardzo pozytywny medycznie i bez wątplenia bardzo wartościowy.

Dyskusja wyników tych dwóch ostatnich części rozprawy doktorskiej Pani mgr Marzeny Pabich jest podobna do poprzedniej: ogromna liczba badań, niezwykle zróżnicowanych i często niespodziewanych wyników, które tworzą materię niebywale trudną do naukowego wyjaśnienia. I podobnie jak poprzednio Autorka bardzo ambitnie próbuje rozwikłać te niezwykle skomplikowane obserwacje i podobnie jak poprzednio odwołuje się do wszystkich możliwych źródeł, które mogłyby pomóc w interpretacji zaobserwowanych zjawisk. I podobnie jak poprzednio Autorka cytuje źródła, które wydają się zbędne. Przy tym o ile zacytowanie badań prowadzonych na soczewicy ma pewne uzasadnienie, to cytowanie badań dotyczących składu i aktywności ziół to już wydaje się za przesadzone. I również jak poprzednio, tworzy to pewien chaos informacyjny. chaosu. Ale te uwagi bardziej o charakterze redakcyjnym nie zmieniają ogólnie niezwykle pozytywnej oceny pracy.

Ocena końcowa rozprawy doktorskiej Pani mg Marzeny Pabich

Ocena jest jednoznacznie bardzo pozytywna. Przedstawione badania są bardzo wartościowe z obu punktów widzenia: naukowego i aplikacyjnego. Już wstępna część pracy dotycząca składu wszystkich dwunastu zarejestrowanych w Polsce odmian nasion soi ma bardzo dużą wartość poznawczą, przede wszystkim wykazując niezbyt zróżnicowaną ich jakość. Dokonano również oceny zawartości związków fenolowych i flawonoidów, aktywności antyoksydacyjnej, zawartości oraz profilu izoflawonów i również nie wykazano większych różnic. Dokonano również ekstrakcji składników z nasion, ale również liści i strączyn i przeprowadzono szczegółową analizę składu cennych prozdrowotnie składników

m.in. związków fenolowych i wybranych ich oddziaływań: aktywności antyoksydacyjnej oraz hamowania aktywności enzymów trawiennych. Przeprowadzono również niezwykle cenne badania antynowotworowe, z pierwszymi elementami optymistycznymi, szczególnie w przypadku raka prostaty. Wyniki i wnioski są bardzo wartościowe naukowo, z wieloma elementami nowatorskimi. Drobne uwagi zawarte w ocenie pracy w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy, ale mają charakter wyłącznie redakcyjno-edukacyjny.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Marzeny Pabich jest wartościową pracą naukową, niezwykle merytorycznie bogatą a elementami nowości naukowych. Niezwykle szeroki zakres analityczny i bardzo szczegółowa dyskusja wyników oznacza, że Kandydatka jest dojrzałym pracownikiem naukowym. Ostatecznie więc potwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Marzeny Pabich spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'J. J.', written in a cursive style.