UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Wydział Technologii Żywności
Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Ul. Balicka 122 30-149 Kraków
tel./fax: 12 662 48 10

dr hab. inż. Marzena Zając, prof. URK
Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

Kraków, 5.01.2023

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Karoliny Ferysiuk pt.: „Jakość i bezpieczeństwo zdrowotne konserw wieprzowych z dodatkiem wierzbówki kiprzycy (*Epilobium angustifolium L.*)" przygotowanej pod kierunkiem promotora – dr. hab. Karoliny Wójciak, prof. UP

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Recenzja została opracowana na zlecenie Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (uchwała z dnia 26.06.202 r.; pismo RD z dnia 28.11.2022). Przedstawiona praca została wykonana w Zakładzie Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, pod kierunkiem prof. UP dr hab. Karoliny Wójciak. Przewód został wszczęty w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

2. Ocena wyboru tematu pracy

Wykorzystywanie soli azotanowych w przetwórstwie mięsa było kontrowersyjne niemal od początku świadomego ich stosowania. Niektórzy eksperci twierdzą, że temat ma raczej znaczenie polityczne. Nie zmienia to faktu, że obawy związane ze spożywaniem soli azotanowych nie są bezpodstawne. Na liście najczęściej wymienianych problemów zdrowotnych, które mogą się pojawić po spożyciu azotanów znajdują się zatrucia związane z ich wysokim stężeniem, methemoglobinemia (zwłaszcza u dzieci) oraz rakotwórczość. Walka o wyeliminowanie azotanów z mięsa została wzmocniona ogłoszeniem przez WHO

o konieczności zmniejszenia spożywania mięsa, w szczególności mięsa czerwonego i przetworzonego, a więc wszelkiego rodzaju wędlin. Działanie kancerogenne oficjalnie wiązane jest z nitrozoaminami, które mogą zostać wytworzone w mięsie peklowanym w określonych warunkach lub też endogennie, w organizmie człowieka. Dodatkowym czynnikiem wspierającym trend eliminujący azotany jest podejście konsumentów i powszechnie znany trend tzw. czystej etykiety. W Europie objawia się on awersją do wszystkich dodatków do żywności a w szczególności tych, które mają oznaczenie „E". Mimo, że na liście Rozporządzenia 1333/2008 znajdują się wyłącznie substancje uznane za bezpieczne dla zdrowia, konsumenci uznają je za szkodliwe. Inne, nieznane dodatki, określane jako wyciągi, ekstrakty itp. są akceptowane niemal bezdyskusyjnie.

Sole azotanowe zostały niemal wycofane z użycia w latach 70tych ubiegłego wieku. Po przeprowadzeniu serii badań wprowadzono pewne zalecenia związane z ich użyciem, które miały spowodować, że produkty wprowadzane na rynek są bezpieczne. Jednym z takich zaleceń było wprowadzanie substancji redukujących, które miały obniżać poziom azotanu resztkowego w wędlinach i przyczyniać się do obniżenia zawartości nitrozoamin w przetworach mięsnych. Inne zalecenia, wprowadzone stosunkowo niedawno, bo w 2014 r., to zakaz stosowania azotanów w produktach surowych. W Stanach Zjednoczonych obowiązuje obniżony dodatek azotanu (III) sodu do bekonu, który tradycyjnie jest smażony, a więc poddany obróbce w wysokiej temperaturze, co jest jednym z czynników przyczyniających się do powstawania rakotwórczych nitrozoamin. Trudno jest w kilku zdaniach opisać złożoność problemu, na który wpływ mają nie tylko same spożywane wędliny, ale wszystkie inne produkty znajdujące się w diecie człowieka, sposób ich przygotowania oraz swoiste czynniki osobnicze.

Komisja Europejska powraca do tematu bezpieczeństwa związanego ze stosowaniem azotanów, ostatni oficjalny raport sporządzono w 2017 roku, natomiast w 2022 pojawił się dokument roboczy dotyczący ryzyka dla zdrowia ludzi związanego z obecnością nitrozoamin w żywności. Jest to więc temat ciągle aktualny, a wykorzystanie nowoczesnych metod badawczych może przyczynić się do odkrycia nowej wiedzy w tym temacie.

Ocenę wyboru tematu oceniam pozytywnie. Doktorantka podjęła trudny temat, podeszła do niego kompleksowo, planując zbadanie najważniejszych aspektów jakościowych i zdrowotnych związanych z obniżaniem azotanów w przetworach mięsnych. Tematyka jest aktualna i wpisuje się w światowe trendy.

3. Ocena formalna pracy

Zbiór publikacji przedstawionych jako przedmiot rozprawy doktorskiej jest złożony z czterech publikacji, z których jedna to praca przeglądowa, we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto, w 2 pracach autorka jest tylko jednym z dwóch, a w pozostałych 2 pracach jednym z trzech współautorów, co uważam za warte podkreślenia. Na uwagę zasługuje również łączna wartość wskaźnika IF dla tego zbioru (20,592) oraz ilość punktów MEiN (370). Całkowity dorobek doktorantki obejmuje 10 publikacji w wysoko punktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym o łącznym IF 37,548.

Praca liczy 163 strony i została podzielona na 12 części: Wstęp, Wprowadzenie – zarys problematyki, Hipoteza badawcza i cel pracy, Układ doświadczeń, Materiał i metody badawcze, Opis wyników i osiągnięć badawczych, Podsumowanie i wnioski; Literatura, Spis tabel i rysunków, Źródła materiałów graficznych, Streszczenie i Streszczenie w języku angielskim. Ponadto, w pracy zamieszczono Wykaz skrótów, Listę publikacji stanowiących przedmiot rozprawy wraz ze wskaźnikami bibliometrycznymi, Zestawienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz Zestawienie całkowitego dorobku naukowego. Rozdział 2 – Wprowadzenie-zarys problematyki został podzielony na trzy podrozdziały; Rozdział 6 - Opis wyników i osiągnięć badawczych podzielono na pięć podrozdziałów, cztery z nich stanowią opis poszczególnych publikacji, a rozdział piąty to propozycja normy, która mogłaby być zastosowana w zakładzie przetwórczym wykorzystującym metodę obniżenia dodatku azotanu z wyciągiem z wierzbówki kiprzycy.

Praca została udokumentowana z wykorzystaniem 5 tabel i 16 rysunków. W opracowaniu autorka zacytowała 103 pozycje literaturowe, wśród których znalazły się również Rozporządzenia i oficjalne Raporty. Publikacje są aktualne i związane z tematem.

Przyjęty układ pracy jest właściwy, opracowanie spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

4. Ocena merytoryczna pracy

W związku z oczekiwaniami konsumentów, wymagających niewielkiej ilości substancji dodatkowych, pochodzących ze źródeł naturalnych, najlepiej roślinnych, powstało wiele prac badawczych, w których naukowcy koncentrują się na wykorzystaniu roślin jako substancji mających być alternatywą dla azotanów. Jednym z pierwszych pomysłów wprowadzonych do

przemysłu były preparaty na bazie selera naciowego stosowane wraz z bakteriami denitryfikującymi. Ekstrakty te są bogate w azotany (V) a bakterie z rodzaju *Staphylococcus carnosus,* lub inne podobne, redukują azotan (V) do reaktywnego azotanu (III). W literaturze naukowej prezentowane są ekstrakty roślinne skutecznie wybarwiające i/lub działające przeciwutleniająco. Często publikowane prace dotykają tylko wizualnych kwestii związanych ze stosowaniem azotanów pomijając istotę ich stosowania, a więc funkcję konserwującą, a w szczególności hamowanie produkcji neurotoksyn przez *Clostridium botulinum.* Ze względu na wielokierunkowe działanie azotanów, ich całkowite zastąpienie jest niemalże niemożliwe.

Cykl publikacji przedstawionych do Recenzji składa się w logiczną całość konsekwentnie zaplanowanych badań mających na celu stwierdzenie kolejno: czy można obniżyć dodatek azotanu (III) sodu do konserw mięsnych; czy można wykorzystać wyciąg z wierzbówki kiprzycy, w celu zniwelowania negatywnych konsekwencji obniżenia dodatku azotanu (III) sodu i ostatecznie: jakie zmiany w produkcie pociąga za sobą modyfikacja z udziałem w/w wyciągu. Interesującym fragmentem badań jest analiza wpływu dodatku roślinnego na aktywność peptydów. Większość badań publikowanych do tej pory koncentrowała się na badaniu biologicznie aktywnych peptydów znajdujących się w wędlinach dojrzewających. W związku z tym ocena zmian aktywności peptydów w konserwach mięsnych jest podejściem nietypowym i bardzo ciekawym.

Nie mam uwag do prezentowanych publikacji. Są to prace, które przeszły proces recenzji przed publikacją, zostały opublikowane w renomowanych, wysoko punktowanych czasopismach, nie widzę potrzeby ponownej ich oceny. Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji stanowi syntetyczny opis poszczególnych osiągnięć, jest napisana bardzo starannie, nie zaleziono błędów literowych ani stylistycznych, sformułowania są jasne i zrozumiałe. Nie brak jednak pewnego rodzaju skrótów myślowych, które wymagałyby dodatkowych wyjaśnień. Zrozumiałym jest, że z uwagi na obszerność przeprowadzonych badań trudno było dokładnie opisać każdy aspekt problemu jakim jest stosowanie azotanów w przetwarzaniu mięsa. Z obowiązku recenzenta muszę również wspomnieć o kilku drobnych niedociągnięciach, których nie ustrzegła się Autorka. Moje uwagi omówię w kolejności występowania w pracy.

We Wstępie i Wprowadzeniu Autorka podała istotne informacje na temat źródeł azotanów w diecie, zagrożeń związanych z obecnością z azotanów w żywności oraz regulacji związanych ze stosowaniem tych związków w przetwórstwie mięsa.

1. W podrozdziale 2.2 Autorka opisuje zagrożenia zdrowotne związane z obecnością azotanów w żywności. Jest to zagadnienie niezwykle złożone. Wydaje się, że pojawiły się tutaj skróty myślowe wymagające wyjaśnienia:
    a. Autorka rozpoczyna rozdział informacją o ryzyku związanym z wykorzystaniem azotanu (III) w przemyśle mięsnym, opisuje reakcje w jakie może wchodzić w kwaśnym środowisku żołądka, zaraz potem podając informację o azotanie (V) - „azotan (V) sodu/potasu wydalany jest przez gruczoły ślinowe" – rzeczywiście tak jest, brak jednak wyjaśnienia z czego to wynika i powiązania z wcześniejszą częścią.
    b. Autorka cytuje badania Anyżewskiej i Wawrzyniak (2014), w której badano ilości pobranych z żywnością azotanów w latach 2006-2012. Wyniki badań pokazują, że w różnych grupach społecznych spożycie azotanów było na poziomie nie przekraczającym 50% ADI. Wyjaśnienia wymaga fragment: „Badanie wpływu pobrania azotanów na ryzyko występowania nowotworu jelita grubego wśród społeczeństwa w latach 1978-2011 wykazało, że ryzyko zachorowania było wysokie nawet przy dawkach poniżej prawnie ustalonych limitów" - czy na pewno Autorka cytuje Anyżewską i Wawrzyniak (2014) czy też są to inne badania?
    c. Strona 13: „Azotany (III) w organizmie człowieka wchodzą w reakcje chemiczne z aminami….. Powstają one przy poddawaniu obróbce cieplnej…." - zdania jedno po drugim sugerują, że nitrozoaminy powstają z azotanów w organizmie po obróbce termicznej. Rzeczywiście, ścieżki powstawania nitrozoamin są dwie: mogą powstać w organizmie człowieka, albo w konkretnych warunkach w mięsie.

2. Dość dużym uproszczeniem jest umieszczenie na schemacie dotyczącym najważniejszych momentów w historii żywości związanych z użyciem soli azotynowych (Rysunek 2, strona 15). Jest to również opisane w publikacji przeglądowej (Publikacja II) stwierdzenia: „ok. X wieku -Starożytny Rzym – świadome stosowanie azotanu(V) potasu w celu zabezpieczenia mięsa przed zepsuciem". Rzeczywiście, w cytowanych tekstach (Keeton, 2017, Bedale i in., 2016) podaje się, że peklowanie mięsa znane było już w Starożytności, jest również podane, że za peklowanie uznawano dodawanie do mięsa soli jako chlorku sodu. Dodatkowo wyjaśnione jest, że dawniej sól była zanieczyszczona innymi solami, wśród których znajdowały się prawdopodobnie

również azotany, co odkryto znacznie później. W związku z tym, nieprawdziwym jest stwierdzenie, że świadomie używano azotanu (V) potasu do zabezpieczania mięsa).

3. Strona 16: warto wspomnieć, że w USA ze względu na sposób przygotowania ograniczono dodatek azotanu (III) do bekonu do 120 ppm.
4. W części 2.1., strona 11, Autorka podaje, że tylko w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie do peklowania dozwolone jest używanie ekstraktów roślinnych bogatych w azotany. Oficjalne stanowisko komisji PAFF z 2018 roku, podtrzymujące stanowisko SCOFCAH z 2006 i 2010 roku mówiące o tym, że stosowanie ekstraktów roślinnych i bulionów warzywnych do przetworów mięsnych zamiast azotanów jest niedozwolone, zostało rozszerzone na wszystkie ekstrakty roślinne. W Polsce i innych krajach europejskich ekstrakty roślinne są stosowane, dodatkowo, o czym Autorka nie wspomina, do produktów mięsnych dodawane są preparaty roślinne bogate w azotany (V) uprzednio przekonwertowane do azotanów (III). Jako że Rozprawa doktorska jest pracą naukową, badania mogą być prowadzone w oderwaniu od obowiązujących regulacji i tym samym stanowić podstawę do zmian w regulacjach. Powstaje jednak pytanie o praktyczny aspekt badań. Biorąc pod uwagę podrozdział 6.5. Norma jakościowa prozdrowotnej konserwy mięsnej, który jest ciekawym elementem pracy, Autorka zapewne zastanawiała się nad wprowadzeniem opracowanej technologii do przemysłu. Pytanie: czy Autorka mogłaby się odnieść do kwestii docelowego wprowadzenia ekstraktu z wierzbówki kiprzycy do produkcji i rozwiązań w tym zakresie? Czy rozwiązanie zostało zgłoszone do Urzędu Patentowego?

Hipoteza badawcza i cel pracy

Autorka postawiła hipotezę, że zastosowanie liofilizowanego ekstraktu z wierzbówki kiprzycy w trakcie produkcji wieprzowej konserwy sterylizowanej pozwoli na zredukowanie ilości azotanu (III) sodu do 50mg/kg. Hipotezę tę Autorka weryfikowała poprzez realizację badań oraz opracowanie przeglądu literatury dotyczącego potencjału ekstraktów roślinnych jako zamienników chemicznych substancji konserwujących. Przedstawiona hipoteza i plan badań są jasne i zwięzłe. Za niefortunne uważam sformułowanie „…chemicznych substancji konserwujących”, jako że wszystkie substancje z jakimi mamy do czynienia, również te naturalne są „chemiczne” czy mają budowę „chemiczną” .

Materiał i metody badawcze

Jak wspomina sama Autorka, do tej pory nie wykorzystywano konserw jako materiału, w którym podejmowano próbę obniżenia dodatku azotanów, co oceniam bardzo pozytywnie. Do realizacji pracy zastosowano szereg metod obejmujących zarówno badania podstawowe jak i bardzo zaawansowane techniki badawcze. Wszystkie metody zastosowano z rozmysłem, odpowiednio do realizacji zamierzonych celów. Badania mogłyby być uzupełnione o analizy związane z hamowaniem aktywności *Clostridium botulinum,* być może Autorka będzie miała taką możliwość w dalszej pracy naukowej.

5. Pewną wątpliwość budzi jednak kwestia produkcji konserw z zastosowaniem współczynnika F=4, a następnie przechowywanie konserw w temperaturze chłodniczej 4°C. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego zastosowano tak niską temperaturę przechowywania i czy w takim razie badanie czystości mikrobiologicznej po 180 dniach przechowywania było zasadne? (w szczególności dotyczy to mikroorganizmów nieprzetrwalnikujących). Ponadto, czy czas przechowywania był adekwatny do zastosowania obróbki cieplnej?

Opis wyników i osiągnięć badawczych

6. W opisie wyników pojawiają się pewne sprzeczności z wynikami opublikowanymi. Autorka stwierdziła (Publikacja I, strona 27), że ilość nitrozylomiochromogenu nie zmieniła się po redukcji azotanu (III) sodu do 50mg, ale udział barwy czerwonej (a*) się zmniejszył. Jednak w Publikacji I zmiana wartości a* nie była istotna statystycznie.

   Co ciekawe, zawartość nitrozylomiochromogenu wzrosła w czasie przechowywana niemal dwukrotnie w próbce bez azotanu. Czy Autorka może podjąć się próby wyjaśnienia tego zjawiska?
   Na tej samej stronie pojawia się zdanie, które również wydaje się być skrótem myślowym: „W związku z jego (azotan III) wysoką reaktywnością, zarówno podczas operacji jednostkowych jak i przechowywania produktu ulega licznym przemianom w tym utlenieniu do azotanu V oraz reakcjami z białkami i lipidami, co prowadzi do jego przereagowania z mioglobiną”. Ze zdania wynika, że inne przemiany i reakcje prowadzą do przereagowania z mioglobiną.
7. Na stronie 32, Autorka wymienia składniki chemiczne charakterystyczne dla wierzbówki kiprzycy, które czynią tę roślinę „jedną z możliwych alternatyw dla

stosowania azotanów". Pragnę zwrócić uwagę, że wszystkie te składniki mogłyby być brane pod uwagę tylko wtedy, gdy użyta zostałaby cała roślina. W ekstrakcie wodnym znajdą się tylko składniki rozpuszczalne w wodzie. Szczególną uwagę zwracam na kwasy tłuszczowe, które rzeczywiście w tej roślinie się znajdują, ale w cytowanych badania ekstrahowane były rozpuszczalnikami organicznymi.

8. Na stronie 24 Autorka podaje, że większe stężenia ekstraktu wierzbówki kiprzycy powodowały wzrost wartości parametru barwy a* oraz że najmniejszy i największy dodatek spowodował destabilizację barwy, natomiast dane znajdujące się w publikacji III wskazują, że wartości te nie były statystycznie istotne. Proszę o wyjaśnienie. Pytanie: Czy na jakimkolwiek etapie analizowano zawartość azotanów (III i V) w samym ekstrakcie?
9. W publikacji IV Autorka porównywała konserwy z dodatkiem wierzbówki w różnych stężeniach wraz z 50mg azotanu (III) sodu z próbą kontrolną zawierającą 100 mg azotanu (III) sodu. Pytanie: dlaczego nie wprowadzono dodatkowej kontroli zawierającej tylko 50mg dodatek azotanu (III) sodu?

Podsumowanie i wnioski

Część ta zawiera najważniejsze osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych badań. Jednakże część z punktów wymienionych jako wnioski jest raczej zbiorem obserwacji, które powinny być podsumowane maksymalnie kilkoma ogólnymi wnioskami.

Inne drobne uwagi:

1. Na stronie 10 użyto wyrażenia „termalna degradacja" – sugeruję użycia: termiczna" jako że termalna zgodnie z definicją słownika języka polskiego odnosi się raczej do wód termalnych, „termalny – dotyczący term, ciepłych łaźni"
2. Na stronie 23 na Rysunku 8, w zestawieniu przeprowadzonych analiz nie została wpisana ocena sensoryczna, która jak wynika z Publikacji, została przeprowadzona
3. Na stronie 32 w wierszu 3, brakuje wartości zawartości polifenoli ogółem, jest tylko jednostka.
4. Na stronie 40, 42 oraz 44 pojawił się błąd: cytowania jest publikacja V zamiast IV

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji Rozprawa doktorska stanowi interesujący cykl publikacji badających możliwości eliminacji lub obniżenia dodatku azotanu (III) do konserw wieprzowych oraz wykorzystania ekstraktu z wierzbówki kiprzycy w celu zrekompensowania ewentualnego obniżenia jakości konserw z obniżonym dodatkiem konserwantu. Jak wspomniano wyżej, cykl sanowi logiczną całość a kolejne publikacje są konsekwencją uzyskanych uprzednio wyników. Autorka przetestowała jakość konserw mięsnych z obniżonym dodatkiem azotanu (III) sodu w porównaniu z próbą kontrolną i stwierdziła że największym wyzwaniem jest proces utleniania zachodzący w konserwie. Następnie sporządziła bazę danych, w której znalazły się rośliny o różnym zakresie działania i na tej podstawie wybrała wierzbówkę kiprzycę do zastosowania w konserwach. W dalszej kolejności, przeprowadziła testy pozwalające dobrać stężenie ekstraktu roślinnego wpływające najbardziej korzystnie na jakość konserwy. Ostatnim krokiem było sprawdzenie czy ekstrakt wpływa na zmianę aktywności peptydów powstających w konserwach. Uzyskane wyniki stanowią cenny wkład w rozwój nauk o żywności i mają silny potencjał aplikacyjny. Praca spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1668 z późn. zm). W związku z tym, wnioskuję do Rady dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Ferysiuk do dalszych etapów postępowania związanego z ubieganiem się o nadanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych.

Dr hab. inż. Marzena Zając, prof. URK