Prof. UPP dr hab. Magdalena Montowska
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Katedra Technologii Mięsa

Poznań, dnia 24 stycznia 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Ferysiuk

pt. „Jakość i bezpieczeństwo zdrowotne konserw wieprzowych z dodatkiem wierzbówki kiprzycy (*Epilobium angustifolium* L.)"

wykonanej w Zakładzie Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością
Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem dr hab. Karliny Wójciak, prof. uczelni

Podstawa wykonania recenzji

Podstawą wykonania recenzji było pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia prof. dr hab. Waldemara Gustawa z dnia 28.11.2022 roku. Recenzję wykonano w oparciu o Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami).

Recenzja została wykonana na podstawie przesłanych materiałów obejmujących rozprawę doktorską w formie papierowej wraz kopiami czterech publikacji powiązanych tematycznie i stanowiących osiągnięcie naukowe oraz oświadczeniami współautorów.

Znaczenie podjętych badań

Konserwy mięsne wciąż są jedną z najbardziej popularnych wśród konsumentów grup przetworów o długim terminie przydatności do pożycia. Są to wyroby, w których powszechnie stosuje się azotany (III) jako dodatek niezbędny w procesie peklowania, i którego funkcję bakteriobójczą, przeciwutleniającą i barwotwórczą bardzo trudno jest zastąpić. Jednak, już co najmniej od kilkudziesięciu lat dyskutowany jest szkodliwy wpływ azotynów i azotanów obecnych w żywności na zdrowie człowieka. Podkreśla się zwłaszcza szkodliwość azotanu(III) wprowadzanego do peklowanego mięsa, którego wolne formy, niezwiązane z barwnikami hemowymi i białkami niehemowymi w sprzyjających warunkach w reakcji z drugo- i trzeciorzędowym aminami mogą tworzyć N-nitrozoamimy, z których wiele ma działanie kancerogenne, mutagenne i teratogenne. Stąd też w ostatnich latach możemy można zauważyć wzrost zainteresowania ekstraktami roślinnymi pozyskiwanymi z liści lub owoców, które są

bogatym źródłem składników bioaktywnych, takich jak polifenole i taniny, jako potencjalnymi zamiennikami azotanu(III) w produktach mięsnych. Wierzbówka kiprzyca jest rośliną pospolitą w Polsce, wykorzystywaną w medycynie ludowej i ziołolecznictwie, natomiast mało znaną szerszej grupie konsumentów. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się zatem w aktualny nurt badań.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Ferysiuk stanowi cykl czterech artykułów, w tym jednej pracy przeglądowej i trzech oryginalnych prac twórczych o charakterze eksperymentalnym. Publikacje ukazały się w czasopismach zamieszczonych w wykazie czasopism naukowych MEiN, tj. w *Foods* i *Antioxidants* (publikacje opublikowane w roku 2020) oraz w *International Journal of Food Science & Technolology* i *Food & Function* (publikacje opublikowane w roku 2022).

We wszystkich publikacjach Doktorantka była pierwszym autorem i z zamieszczonych oświadczeń współautorów publikacji wynika, że miała bardzo duży wkład w ich powstanie. Procentowy udział mgr inż. Karoliny Ferysiuk w przygotowaniu publikacji wynosi od 80 do 90%. Doktorantka współuczestniczyła w tworzeniu koncepcji pracy, opracowaniu metodyki, brała udział w wykonaniu doświadczeń, analizie wyników i przygotowaniu publikacji. Wiodący wkład w powstanie prac upoważnia mgr inż. Karolinę Ferysiuk do wskazania ich jako podstawę ubiegania się o stopień doktora. Prace opublikowano w czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports* (JCR). Sumaryczny *Impact Factor* (IF) tych prac wynosi 20,592, a suma punktów według wykazu czasopism naukowych MEiN wynosi 370.

Opracowanie ma typowy dla rozpraw doktorskich, realizowanych w oparciu o spójny tematycznie zbiór publikacji, układ podziału treści. W pierwszej części, która obejmuje 77 stron, Doktorantka zamieściła wykaz publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, wstęp, wprowadzenie do tematyki, hipotezę i cel pracy, układ doświadczeń, materiał i metody badawcze, opis wyników i osiągnięć badawczych, podsumowanie i wnioski, piśmiennictwo, spis tabel i rysunków oraz streszczenie. Druga część opracowania zawiera kopie publikacji stanowiących przedmiot rozprawy i oświadczenia autorów odnośnie ich indywidualnego wkładu w powstałe prace. Spis piśmiennictwa obejmuje 104 pozycje literaturowe. W zdecydowanej większości są to artykuły anglojęzyczne z ostatnich lat bezpośrednio powiązane z tematyką pracy doktorskiej. Przedstawiona rozprawa od strony formalnej nie budzi zastrzeżeń.

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa porusza zagadnienia związane z funkcją technologiczną jaką pełnią azotyny i azotany w żywności i zagrożeniami zdrowotnymi związanymi z ich obecnością. Autorka skupiła się na ocenie możliwości zredukowania dodatku azotanu(III) sodu o połowę dopuszczalnej przez przepisy ilości w konserwie wieprzowej sterylizowanej poprzez suplementację liofilizowanym ekstraktem wodnym z liści wierzbówki kiprzycy. Weryfikację sformułowanej hipotezy badawczej przeprowadzono poprzez realizację czterech celów przedstawionych w rozdziale 3 „Hipoteza badawcza i cel pracy", odnoszących się do etapów badań, którym odpowiadają kolejno publikacje wchodzące w skład osiągnięcia. Rozdział 4 „Układ doświadczeń" to w zasadzie tabela prezentująca tytuły publikacji i ich założenia, przy czym założenia to przepisane z poprzedniego rozdziału cele szczegółowe pracy. W takim ujęciu w opinii recenzenta ten rozdział jest zbędny, powtarza jedynie treści zawarte w poprzednich rozdziałach. Chciałabym w tym miejscu zwrócić uwagę na niedociągnięcie jakim jest błędne użycie przez Autorkę w tabeli 1 pojęcia „założenia". Założenie to hipoteza na temat relacji między zmiennymi, które poddaje się weryfikacji.

Mam zastrzeżenie do tytułu rozprawy, który nie odpowiada w pełni głównemu celowi pracy i treściom zawartym w publikacjach I i II. W publikacji I nie badano konserw z dodatkiem wierzbówki kiprzycy, podobnie w publikacji II przeglądowej nie zaprezentowano zastosowań tej rośliny w produkcji wyrobów mięsnych. W mojej opinii niniejsza rozprawa - jako cykl publikacji - odnosi się bardziej do ogólnego zagadnienia jakim jest jakość i bezpieczeństwo zdrowotne konserw z obniżoną zawartością azotanu(III) sodu.

W rozdziale „Materiał i metody badawcze" Autorka omówiła sposób przygotowania i skład badanych prób oraz zamieściła schemat prezentujący analizy wykonywane w poszczególnych terminach. W tej części zabrakło mi informacji na temat metod, które wykorzystano do przeprowadzenia poszczególnych analiz, z podaniem, w którym z artykułów naukowych wykorzystano poszczególne metody badawcze. Ten brak Doktorantka starała się nadrobić w rozdziale „Opis wyników i osiągnięć badawczych", w którym przy omawianiu poszczególnych publikacji wymieniła wykonywane analizy. Niemniej jednak te informacje z wraz z podaniem metodyk i powołaniem się na źródła literaturowe powinny znaleźć się w części metodycznej pracy. Odesłanie czytelnika do informacji zamieszczonych w publikacjach nie jest zalecanym rozwiązaniem. Podczas obrony pracy dysertacyjnej prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie dlaczego liofilizowany ekstrakt dodawano w ilościach 50-1000 mg/kg. Interesuje mnie zwłaszcza czym była uzasadniona różnica pomiędzy zastosowaną ilością 150 a 1000 mg/kg.

Metodyki zostały odpowiednio dobrane. Na uwagę zasługuje użycie nowoczesnych technik analitycznych (chromatografii gazowej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej, spektrometrii mas i narzędzi bioinformatycznych) oraz szeroki zakres analiz do oceny cech jakościowych i bezpieczeństwa zdrowotnego. W zależności od publikacji, oznaczono m.in. zdolność antyoksydacyjną DPPH, FRAP i ABTS, wskaźnik TBARS, zawartość N-nitrozoamin, cholesterolu, ogólną liczbę bakterii mezofilnych oraz bakterii *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, a także określono profil fitochemiczny ekstraktu z wierzbówki kiprzycy i jego aktywność przeciwbakteryjną, ponadto określono potencjał bioaktywny zidentyfikowanych peptydów z użyciem narzędzi bioinformatycznych. Układ poszczególnych doświadczeń, zastosowanie różnorodnych metod fizycznych, chemicznych, mikrobiologicznych i statystyczne opracowanie wyników wskazują na bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego przez Doktorantkę.

Omówienie wyników Autorka rozpoczyna od oceny wpływu wyeliminowania lub obniżenia ilości azotanu(III) sodu (do poziomu 50 mg/kg) na właściwości fizykochemiczne, sensoryczne i bezpieczeństwo zdrowotne konserwy wieprzowej (publikacja I). Zauważono, że ze względu na obniżoną zdolność wychwytywania wolnych rodników i niestabilność barwy w trakcie przechowywania, konieczna jest suplementacja produktu z częściową redukcją azotynu materiałem roślinnym o właściwościach antyoksydacyjnych. W publikacji II Doktorantka dokonała przeglądu roślinnych substytutów azotynów i azotanów w wyrobach mięsnych z uwzględnienie ich wpływu na zapewnienie wysokiego poziomu ochrony mikrobiologicznej, stabilności oksydacyjnej oraz akceptowalnej jakości sensorycznej (barwa, smak, zapach). Autorka wskazuje na brak prac badawczych oceniających możliwość zastosowania ekstraktu z wierzbówki kiprzycy w produktach mięsnych.

W kolejnych badaniach przeprowadzono ocenę profilu fitochemicznego i aktywności przeciwbakteryjnej liofilizowanego wodnego ekstraktu z wierzbówki kiprzycy oraz jego dodatku na cechy jakościowe i bezpieczeństwo zdrowotne konserwy wieprzowej (publikacja III). Interesujące jest wykazanie, że dodatek liofilizowanego ekstraktu w ilości 150 mg/kg zapobiegał powstawaniu N-nitrozoamin oraz stabilizował barwę i właściwości antyoksydacyjne produktów w trakcie przechowywania. Za bardzo interesujące uważam badania aktywności biologicznej zidentyfikowanych peptydów w konserwach z dodatkiem ekstraktu (publikacja IV). Nasuwa mi się jednak pytanie dlaczego analizę oceny bioaktywnych peptydów w badaniu *in silico* przeprowadzono dla sekwencji peptydów wspólnych dla wszystkich analizowanych prób skoro celem pracy była ocena wpływu dodania różnych ilości ekstraktu na aktywność biologiczną peptydów w konserwach. Z tabeli 2 i rysunku 1 umieszczonych w publikacji IV wynika, że

poszczególne warianty znacznie się różniły pod względem ilości sekwencji peptydowych zidentyfikowanych techniką spektrometrii mas. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tej kwestii. Zabrakło mi również informacji na temat pochodzenia zidentyfikowanych fragmentów. Skoro do identyfikacji użyto algorytmu MASCOT a grupą taksonomiczną wybraną do porównań były ssaki, to można było ocenić zróżnicowanie badanych prób chociażby ze względu na ilość peptydów pochodzących z białek miofibrylarnych, enzymatycznych i mających funkcje regulatorowe. Jeśli to możliwe to proszę o uzupełnienie tych informacji w trakcie obrony. Wyniki badań *in vitro* właściwości przeciwutleniających peptydów wskazują na istotny wpływ ilości ekstraktu na potencjał przeciwutleniający peptydów wyekstrahowanych z analizowanych prób. Opis wyników kończy opracowana przez Doktorantkę norma jakościowa konserwy mięsnej sterylizowanej ze zredukowaną ilością azotanu(III) sodu z dodatkiem ekstraktu z wierzbówki kiprzycy.

Pracę wieńczy dziewięć prawidłowo sformułowanych i logicznych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań. W mojej opinii, przeprowadzone badania mają wysoką wartość naukową, a także są cenne pod względem praktycznym. Rozprawa wskazuje na odpowiedni poziom wiedzy teoretycznej i praktycznej Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Na zakończenie pragnę zwrócić uwagę Autorce aby w przyszłości dokładała większej staranności w unikaniu błędów stylistycznych, interpunkcyjnych i literowych, a także na fakt, że nie wszyscy autorzy przywołani w tekście znaleźli się w spisie literatury, a w spisie są autorzy do których nie ma odniesienia w tekście opracowania.

Wniosek końcowy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Ferysiuk dostarcza wartościowych i oryginalnych wyników badań w zakresie możliwości stopniowego redukowania dodatku azotanu(III) sodu w sterylizowanych wyrobach mięsnych. Realizacja pracy wymagała dużej wiedzy merytorycznej i zaangażowania. Przygotowana rozprawa w formie zbioru publikacji świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowej i zespołowej. Wyniki zamieszczone w publikacjach poszerzają stan wiedzy w dyscyplinie technologia żywności i żywienia i mają również potencjał aplikacyjny.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. mgr inż. Karoliny Ferysiuk pt. „Jakość i bezpieczeństwo zdrowotne konserw wieprzowych z dodatkiem wierzbówki kiprzycy (*Epilobium angustifolium* L.)" spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, zarówno pod względem formalnym jak i merytorycznym, zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo

o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami) i zwracam się do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Ferysiuk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

prof. UPP dr hab. Magdalena Montowska