

Prof. dr hab. inż. Lesław Juszcak
Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. H.Kołłątaja w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Patrycji Sowy

**pt.: „ Wpływ dodatku nostrzyka białego (*Melilotus albus*)
na zawartość związków biologicznie czynnych w miodach nektarowych”**

**wykonanej w Zakładzie Chemii i Toksykologii Żywności,
Uniwersytetu Rzeszowskiego**

pod kierunkiem dr inż. hab. prof. UR Małgorzaty Dżugan

oraz promotora pomocniczego dr inż. Marii Tarapatskyy

Podstawą przygotowania recenzji było pismo Prorektora ds. Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 02.12.2020 r.

Miód oraz produkty pszczele są wartościowymi składnikami diety człowieka. Stanowią one cenne i bogate źródło związków biologicznie czynnych. Stosowane są one od wieków w tradycyjnej medycynie ludowej, ze względu na szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego, przeciwrodnikowego, przeciwutleniającego, przeciwnowotworowego i wspomagającego w profilaktyce i leczeniu wielu chorób. Produkty pszczele mogą stanowić również atrakcyjne składniki żywności prozdrowotnej i funkcjonalnej, ze względu na ich znaczny potencjał przeciwutleniający. Liczne badania wskazują, że skład miodów oraz pozostałych produktów pszczelich i wynikająca stąd ich aktywność biologiczna zależy od wielu czynników, takich jak: źródło nektaru, pora roku, warunki klimatyczne i środowiskowe, czynniki genetyczne i wiele innych.

Polska jest jednym z czołowych producentów miodu w Unii Europejskiej i pod względem produkcji zajmuje 4. pozycję, a udział Polski w unijnej produkcji wynosi 9 proc. W latach 2015-2019, roczna produkcja miodu pszczelego w Polsce w zależności od warunków pogodowych wahała się od 15 do 24 tys. ton. Polski miód, z uwagi na unikalny

skład chemiczny, jest zdrowym produktem dietetycznym i źródłem wielu cennych składników odżywczych i biologicznie aktywnych. W ostatnim czasie obserwowane są zmiany w preferencjach konsumentów w kierunku nabywania produktów naturalnych, prozdrowotnych i ekologicznych, dlatego wzrasta również zainteresowanie miodem oraz innymi produktami pszczelimi. Ponadto pszczelarstwo pozwala na utrzymanie roślinności wymagającej zapylenia, a produkty pszczele mają również zastosowanie w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym.

Tematyka związana miodem wzbudza również szerokie zainteresowanie wśród naukowców, a najlepszym na to dowodem jest ilość prac naukowych abstraktowanych w bazie Scopus. Liczba artykułów naukowych zawierających w tytule, abstrakcie lub w słowach kluczowych słowo „miód” wynosiła w 2015 roku 1704, natomiast w 2020 roku już 2647. Wskazuje to na ciągłą aktualność tej tematyki, a więc i celowość badań podjętych przez Doktorantkę, szczególnie iż dotyczą one mało przebadanej odmiany miodu oraz otrzymywania miodu wzbogacanego. Sformułowany przez Autorkę tytuł pracy jest zwięzły i jasny, chociaż nie w pełni odpowiada treściom zawartym w dysertacji, gdyż nie uwzględnia wykorzystania nostrzyka żółtego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest prawidłowo przygotowanym pod względem naukowym i graficznym opracowaniem i ma układ typowy dla takich prac. Liczy ona wraz z aneksem 174 strony i podzielona jest na 10 zasadniczych rozdziałów. Pierwszy z nich stanowi wstęp obejmujący przegląd literatury. Następne rozdziały to cel pracy i hipotezy badawcze, układ doświadczenia oraz materiał i metody. Kolejne rozdziały stanowią: wyniki i dyskusja, podsumowanie i wnioski, bibliografia oraz aneks. Całość pracy zamyka streszczenie w języku polski oraz w języku angielskim. Zasadnicza część pracy zawiera 47 rysunków oraz 23 tabele. Ponadto, w aneksie Autorka zamieściła 11 tabel i 2 rysunki.

Liczący 29 stron rozdział „Wstęp” obejmuje zwięzły przegląd literatury dotyczący składu chemicznego i aktywności biologicznej miodu, możliwości wzbogacania miodu w roślinne składniki bioaktywne, charakterystyki nostrzyka jako surowca zielarskiego oraz pożytku pszczelego, a także charakterystyki samego miodu nostrzykowego. Ze względu na potencjalną toksyczność, Autorka zwróciła również uwagę na bezpieczeństwo wykorzystania nostrzyka jako źródła kumaryny. Treść przeglądu literatury oparta jest na aktualnych i źródłowych publikacjach zamieszczonych w indeksowanych czasopismach naukowych. Zakres przeglądu literatury jest merytorycznie uzasadniony i dobrze wprowadza w problematykę przeprowadzonych badań. Całość przeglądu literatury jest interesująca i pozwala czytelnikowi na pełną orientację w przedstawianej problematyce. Stanowi on również dobre i wyczerpujące wprowadzenie do części eksperymentalnej pracy i potwierdza bardzo dobrą znajomość tematyki przez Autorkę. Przegląd literatury jest również wzbogacony materiałem ilustracyjnym w postaci fotografii i struktur związków bioaktywnych.

Szczegółowa lektura tej części dysertacji nasuwa dwie zasadnicze uwagi:

str. 6, 28 – sformułowania „...zioł jako dodatków do żywności” lub „Nostrzyk jako dodatek do żywności” są nieprecyzyjne, zioła nie mają statusu substancji dodatkowych zgodnie z przepisami UE, więc mogą być jedynie składnikami,

str. 13, 14 – Autorka nadużywa sformułowania „norma” mając na myśli najwyższy dopuszczalny poziom (najwyższą dopuszczalną zawartość) cytując przy tym Dyrektywy lub Rozporządzenia.

Kolejną część dysertacji stanowi cel pracy i hipotezy badawcze (rozdział 2). W miejscu tym Autorka sprecyzowała główny cel pracy oraz cele szczegółowe i postawiła trzy hipotezy badawcze. Zarówno cele jak i hipotezy badawcze są przedstawione w sposób prawidłowy i wynikają one z przeglądu literatury. W tym miejscu nasuwa się pytanie: dlaczego Autorka zainteresowała się właśnie nostrzykiem jako rośliną, którą można wykorzystać do wzbogacania miodów? Co wyróżnia tę roślinę wśród innych wykorzystywanych np. do otrzymywania ziołomiodów?

W następnym rozdziale „Układ doświadczenia” (rozdział 3) Autorka zaprezentowała poszczególne etapy badań oraz w formie tabelarycznej schemat prowadzenia poszczególnych analiz. Ze względu na ilość przeprowadzonych analiz i złożoność materiału badanego zestawienie to jest bardzo pomocne w ogólnej orientacji w układzie doświadczalnym.

Kolejny rozdział „Materiał i metody” (rozdział 4) podzielony jest na dwa zasadnicze podrozdziały w których Autorka prezentuje kolejno: materiał badany (4.1) oraz metodykę badawczą (4.2). Materiał badany stanowią miody nostrzykowe, dwa gatunki i dwie formy nostrzyka pozyskiwane w trzech fazach wegetacji oraz miody wzbogacane suszonym nostrzykiem lub suchymi ekstraktami nostrzyka. W podrozdziale tym Autorka wyspecyfikowała również wykorzystane odczynniki, jednak stosując błędna numerację podrozdziału (4.1.3.). Całość opisu materiału badanego jest przygotowana prawidłowo i bardzo szczegółowo. Ze względu na dość skomplikowany układ doświadczalny pozwala to czytelnikowi na pełną orientację w pochodzeniu materiału doświadczalnego oraz sposobie przygotowania miodów wzbogaczanych.

Kolejny podrozdział tej części pracy stanowi szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych (4.2). Oprócz standardowych oznaczeń stosowanych w ocenie jakości miodu, Doktorantka wykorzystwała szereg metod chromatograficznych obejmujących różne warianty wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz chromatografię gazową sprzężoną z spektrometrią mas (GC-MS), a także elektroforezę. Autorka oznaczyła również metodami spektrofotometrycznymi całkowitą zawartość związków fenolowych oraz aktywność przeciwnadciwnikową w stosunku do DPPH^{*} i zdolność redukcyjną metodą FRAP. Doktorantka przeprowadziła również ocenę sensoryczną. Ponadto we współpracy z Uniwersytetem w Nitrze (Słowacja) określiła aktywność przeciwdrobnoustrojową metodami dyfuzyjno-krażkową oraz dyfuzyjno-studzienkową. Z kolei we współpracy z Uniwersytetem w Koszycach (Słowacja), Doktoranta wykonała ocenę cytotoksyczności ekstraktów i miodów wzbogaczanych. Natomiast we współpracy z Uniwersytetem Lwowskim (Ukraina) Autorka oceniła, wykorzystując zwierzęta doświadczalne, zdolność do hamowania agregacji płytek krwi. W tym miejscu należy podkreślić bardzo szerokie spektrum zastosowanych metod analitycznych wymagających dużej wiedzy i umiejętności praktycznych, a także wykorzystanie współpracy zagranicznej. Całość wyników została poddana analizie statystycznej obejmującej jedno- lub dwuczynnikową analizę wariancji oraz test Tukey’a lub Dunnetta, pozwalające na ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi, a także analizę korelacyjną w oparciu o współczynniki korelacji liniowej Pearsona. Do oceny

wyników Doktorantka zastosowała również zaawansowane metody wielowymiarowe: analizę składowych głównych oraz analizę skupień w połączeniu z mapą cieplną.

Lektura tej części pracy nasuwa kilka uwag i pytań:

str. 47, 48, 52 – zamiast prędkości obrotowej (obr./min lub rpm) powinna być podawana wartość siły odśrodkowej,

str. 48 – Autorka podaje zastosowanie detektora wyładowań koronowych, ponieważ jest to bardzo specyficzna detekcja, proszę aby Autorka wyjaśniła na czym ona polega?

str. 49 – czy Autorka zbadała odzysk ekstrakcji materiału roślinnego?, jeżeli tak to jakiego rzędu były to wartości?

str. 49 – Autorka podaje, że do oznaczania związków fenolowych wykorzystwała detektor PDA, jednak dalej przywołuje charakterystyczne dla oznaczanych związków długości fali co sugeruje użycie detektora UV-Vis lub DAD, proszę o wyjaśnienie,

str. 52 – „dodawano odrobinę” – określenie nieprecyzyjne,

str. 53. – Autorka wymiennie użyła sformułowania: „Ocena organoleptyczna” i „Analiza sensoryczna” – czy te pojęcia są tożsame? proszę wyjaśnić,

str. 53 – „przez całą noc” – określenie nieprecyzyjne, brak podanej temperatury,

str. 57 – zamiast „o wadze” powinno być „o masie”.

Kolejna część pracy to omówienie wyników i dyskusja (rozdział 5). Rozdział ten jest logicznie podzielony na cztery zasadnicze podrozdziały, w których Autorka przedstawiła, oceniła i przedyskutowała wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy. Wyniki są przedstawione w logiczny i uporządkowany sposób, chociaż w opinii recenzenta niepotrzebnie ich część została przeniesiona do aneksu. W pierwszym podrozdziale (5.1) Autorka dokonała charakterystyki miodu nostrzykowego, wskazując na wstępie, że przeprowadzona analiza melisopalinologiczna wykazała że jedynie 14 spośród 30 pozyskanych próbek można zakwalifikować jako próbki miodów nostrzykowych. W tej części pracy Autorka scharakteryzowała badane miody nostrzykowe pod względem parametrów determinujących ich jakość handlową, właściwości przeciwutleniające oraz profil związków polifenolowych, lotnych i białkowych. Wyniki zaprezentowane w tej części pracy należy uznać za szczególnie cenne, gdyż jest to pierwsza tego typu charakterystyka krajowych miodów nostrzykowych.

W kolejnym podrozdziale (5.2) Doktorantka scharakteryzowała nostrzyk jako źródło, składników bioaktywnych. Opisała zidentyfikowane i oznaczone składniki bioaktywne należące do flawonoidów, związków kumarynowych oraz kwasów fenolowych, zwracając uwagę również na zawartość tych związków w liściach nostrzyka w zależności od fazy wegetacji. Przeanalizowała również aktywność przeciwutleniającą i zdolność redukcyjną ekstraktów z suszonych liści, w tym zebranych w trzech fazach wegetacji, oraz kwiatów nostrzyka. Uzyskane wyniki pozwoliły Autorce stwierdzić, że kwiaty nostrzyka stanowiły lepsze źródło związków polifenolowych niż liście, przy czym liście, ze względu na występowanie barwników, odznaczały się wyższą aktywnością przeciwutleniającą.

Kolejny rozdział (5.3) dotyczy charakterystyki miodów wzbogacanych nostrzykiem. W tym miejscu Autorka przeanalizowała wpływ rodzaju i ilości zastosowanego dodatku nostrzyka na zawartość i profil związków fenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą

i zdolność redukcyjną. Ponadto porównała skuteczność wzbogacania miodu nostrzykiem białym i żółtym oraz suchym ekstraktem z nostrzyka. W rozdziale tym Doktorantka przeanalizowała również wpływ odmiany miodu na właściwości produktu wzbogaconego oraz porównała właściwości miodu nostrzykowego i miodów wzbogaconych nostrzykiem. Uzyskane wyniki pozwoliły Autorce stwierdzić, że miód wzbogacony związkami bioaktywnymi nostrzyka białego (*Melilotus albus*) wykazuje istotnie wyższą zawartość związków bioaktywnych w porównaniu do naturalnego miodu nostrzykowego. Wzmocnienie działania przeciwutleniającego i przeciwbakteryjnego jest związane ze wzrostem zawartości związków fenolowych. Najlepszy stopień wzbogacenia w kumarynę można uzyskać stosując jako składnik kwiaty lub liście nostrzyka uzyskane we wczesnej fazie wegetacji. Ponadto Doktorantka wykazała, że miód rzepakowy w porównaniu do miodu lipowego wykazuje lepsze cechy jako matryca do wzbogacenia, ze względu na szybszy czas kremowania oraz lepszy efekt wzbogacenia w kumarynę. Ponadto miody rzepakowe z dodatkiem nostrzyka charakteryzowały się lepszymi walorami organoleptycznymi, szczególnie konsystencją i smakowitością.

W następnym rozdziale (5.4) autorka przedstawiła i omówiła wyniki dotyczące aktywności biologicznej ekstraktów roślinnych i miodów wzbogaconych. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że wzbogacenie miodu rzepakowego dodatkiem nostrzyka zwiększyło jego aktywność przeciwbakteryjną, szczególnie wobec bakterii Gram-dodatnich. Ponadto Autorka zaobserwowała, że miód wzbogacony może działać ochronnie na komórki nabłonka jelitowego, zwiększa ich aktywność metaboliczną i nie wpływa na zdolność do proliferacji. Ponadto stwierdziła, że miód z dodatkiem kwiatów nostrzyka wykazuje zdolność do hamowania agregacji płytek krwi, co może wskazywać na potencjalne zastosowanie produktu w profilaktyce nadkrzepliwości krwi.

Lektura tej części pracy nasuwa również kilka uwag:

str. 78 – poziomy 0,17-0,21 oraz 0,42-0,50 mg/g s.m. nie można uznać za zbliżone;

str. 78 – zakresy zazwyczaj są podawane od najniższej do najwyższej wartości, czyli między 0,43 a 1,35 mg/g oraz 3,46 a 8,68 mg/g;

str. 81-83 – niezgodna z numeracją kolejność tabel;

str. 85 – Autorka podaje „Badania...pochodzą sprzed 20 lat” cytując publikację z 2016 roku;

str. 96 – „wzmocnienie miodu” – niezręczne sformułowanie,

tabele 15, 16, 20 – wątpliwości budzi zastosowanie tylko testu Dunnetta, ponieważ pozwala on jedynie na wnioskowanie o istotności różnic pomiędzy próbą kontrolną (miodem rzepakowym) a próbami badanymi, nie uwzględniając zróżnicowania statystycznego w obrębie samych prób badanych,

tabela 21 – brak oceny istotności różnic.

Wyniki i dyskusję zamyka krótkie podsumowanie i dziesięć syntetycznie sformułowanych wniosków (rozdział 6) bezpośrednio wynikających z przeprowadzonych badań i otrzymanych danych. Wnioski te bardzo dobrze odzwierciedlają uzyskane wyniki, ich interpretację i dyskusję. Zawierają również wiele istotnych informacji o charakterze poznawczym oraz aplikacyjnym.

Kolejną częścią pracy to bibliografia (rozdział 7). W wykazie wykorzystanej literatury Autorka rozprawy zamieściła ściśle powiązane z tematyką pracy 223 pozycje literaturowe oraz dwa źródła internetowe, obejmujące publikacje źródłowe oraz najnowsze prace, opublikowane w czasopiśmie o wysokiej randze naukowej. Świadczy to o obszernej wiedzy Doktorantki oraz jej skrupulatnym przygotowaniu do realizacji zaplanowanych działań.

W aneksie do pracy (rozdział 8) Autorka zamieściła jedenaście tabel oraz dwa rysunki, stanowiące uzupełnienie wyników prezentowanych w zasadniczej części pracy. Całość pracy zamyka streszczenie (rozdział 9) w języku polskim, syntetycznie prezentujące cel i zakres badawczy, zastosowane metody oraz najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Streszczenie to jest również przetłumaczone na język angielski (rozdział 10).

Wszystkie zawarte w recenzji uwagi mają charakter kosmetyczny i nie umniejszają ogólnej wartości pracy, a całość lektury pozwala na bardzo pozytywną ocenę założeń rozprawy, jej wartości merytorycznej, przedstawienia i dyskusji wyników oraz wyciągniętych wniosków.

Podsumowanie

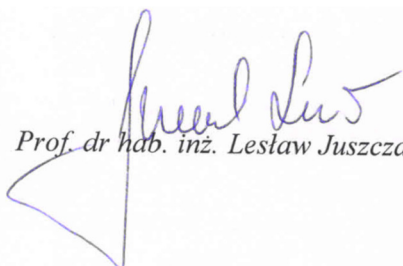
Praca doktorska Pani mgr inż. Patrycji Sowy jest interesującą, wartościową rozprawą naukową dotyczącą charakterystyki miodu nostrzykowego oraz możliwości wzbogacania miodów odmianowych związkami bioaktywnymi nostrzyka wprowadzanymi w różnej formie. Ze względu na brak danych literaturowych, za szczególnie interesujące uważam wyniki dotyczące charakterystyki miodów nostrzykowych oraz porównanie ich właściwości z miodami wzbogaczanymi nostrzykiem. Przygotowanie przez Autorkę rozprawy świadczy o jej naukowej dojrzałości, praktycznej znajomości metod badawczych, szczególnie zaawansowanych metod chromatograficznych, oraz obszernej wiedzy teoretycznej związanej z podjętym zagadnieniem. Wyniki badań prezentowane w pracy uzyskano z wykorzystaniem prawidłowo dobranych nowoczesnych metod analitycznych. Zostały one następnie poddane wnikliwej analizie, m.in. za pomocą zaawansowanych wielowymiarowych metod statystycznych, oraz szczegółowej dyskusji. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki oraz wysunięte na tej podstawie wnioski mogą znaleźć również odzwierciedlenie w praktyce.

Uważam zatem, że rozprawa Pani mgr inż. Patrycji Sowy spełnia wszystkie warunki stawiane pracom na stopień doktora w świetle ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie składam wniosek do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Sowy. Wykonane przez Doktorantkę badania oraz przygotowana rozprawa dotycząca charakterystyki miodu nostrzykowego oraz wykorzystanie różnych form nostrzyka do wzbogacania miodów odmianowych doskonale wpisują się w trend badań nad żywnością funkcjonalną. Prezentowane w dysertacji wyniki Autorka uzyskała z wykorzystaniem różnorodnych, nowoczesnych metod analitycznych, szczególnie chromatograficznych, a ich szeroki zakres wskazuje na bardzo dobrą znajomość technik badawczych oraz obszerną wiedzę. W mojej opinii Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia badań

naukowych na wysokim poziomie, a uzyskane wyniki poddane szczegółowej analizie statystycznej, z zastosowaniem zaawansowanych technik wielowymiarowych, odpowiednio przedyskutowane oraz wyciągnięte wnioski mogą znaleźć swoje odzwierciedlenie nie tylko w publikacjach naukowych, ale również w procesie projektowania nowych funkcjonalnych produktów spożywczych bogatych w składniki bioaktywne o właściwościach prozdrowotnych. Ponadto przedstawiona do oceny dysertacja jest przygotowana bardzo starannie, a na szczególne uznanie zasługuje pojęta przez Autorkę współpraca i realizacja części badań w zagranicznych instytucjach naukowych.

Kraków, 18 styczeń 2021 r.



Prof. dr hab. inż. Lesław Juszcak