

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Darewicz

Olsztyn, 07.12.2024 r.

Katedra Biochemii Żywności

Wydział Nauki o Żywności

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

w Olsztynie

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Lasoń-Rydel**

**zatytułowanej**

**„Opracowanie innowacyjnego systemu analitycznego opartego na kompleksowym badaniu składu aminokwasów i dipeptydów w wieloskładnikowych matrycach rolno-spożywczych i medycznych”**

**wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Tomasza Olejnika oraz promotora pomocniczego dr hab. inż. Katarzyny Ławińskiej w Politechnice Łódzkiej w Łodzi w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy**

**Recenzję wykonano na podstawie pisma Dziekan Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w Łodzi dr hab. Edyty Gendaszewskiej-Darmach, prof. uczelni z dnia 09.10.2024 r., zgodnie z Uchwałą Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Politechniki Łódzkiej w Łodzi z dnia 08.10.2024 roku.**

### **Dobór i znaczenie tematyki**

Od starożytnych czasów istniała świadomość zależności zdrowia człowieka od racjonalnego odżywiania. Dotychczas jednak zwracano głównie uwagę na występowanie poszczególnych składników w diecie które, dostarczane w odpowiednich ilościach zgodnych z zapotrzebowaniem, zapewniały prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Nowe podejście polega na przypisaniu żywności szczególnej roli ponadżywczej. Żywność dodatkowo wzbogacona aktywnymi składnikami stosowanymi w żywieniu, staje się ogniwem pośrednim między żywnością w ujęciu tradycyjnym a lekiem. Są to więc specjalnie surowce/spreparowane produkty spożywcze czy środki spożywcze, które wykazują korzystny, udokumentowany wpływ na zdrowie. W zależności od rodzaju składników, wzbogacających produkt spożywczy, uzyskuje się różne efekty prozdrowotne.

Do takich składników należą aminokwasy i peptydy. Analiza składu aminokwasowego dotyczy zarówno próbek zawierających aminokwasy w stanie wolnym jak i próbek białek oraz peptydów (tutaj wymagana jest poprzedzająca hydroliza np. enzymatyczna) i służy do charakterystyki żywności oraz oceny procesów technologicznych jakim ta żywność jest poddawana. Idealna technika stosowana w analizie składu aminokwasowego powinna być ilościowa i powinna charakteryzować się dużą rozdzielczością oraz selektywnością (ze względu na znaczną liczbę oznaczanych aminokwasów). Ponadto, powinna charakteryzować się prostotą, szybkim czasem oznaczeń, wysoką czułością, wysoką powtarzalnością a zarazem możliwie niskim kosztem analiz. Generalnie w olbrzymiej większości laboratoriów do analizy składu aminokwasowego próbek stosuje się albo chromatografię jonowymienną, albo chromatografię z odwróconymi fazami. Chromatografia gazowa jest jedną z rzadziej stosowanych technik w analizie aminokwasowej. Głównym ograniczeniem tej metody jest konieczność przeprowadzenia aminokwasów w lotne pochodne. Oznaczanie aminokwasów i peptydów odgrywa kluczową rolę podczas wprowadzania żywnościowych innowacji produktowych na rynek w aspekcie wykazania cech nowości proponowanego rozwiązania. Szczególnym wyzwaniem jest opracowanie sposobów postępowania analitycznego skierowanego do różnych matryc żywnościowych obejmujące włączanie w strumień żywności produktów ubocznych i ograniczanie powstawania produktów odpadowych. Stąd podjęta tematyka zestawienia i opracowania metod i technik badawczych do oznaczania aminokwasów/peptydów w różnych matrycach spożywczych wpisuje się w nurt badań prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Tematyka jest ciekawa nie tylko odnośnie poszerzania wiedzy na temat aminokwasów i peptydów żywności ale także ma aspekt praktyczny tj. uzyskania nowych rozwiązań zgodnych z założeniami zrównoważonego rozwoju oraz wspierania działań profilaktycznych w aspekcie zdrowia publicznego w obszarze „food, nutrition and health”.

### **Ocena formalna pracy**

Przedstawiona przez p. mgr inż. Magdalenę Lasoń-Rydel do recenzji dysertacja zatytułowana: „Opracowanie innowacyjnego systemu analitycznego opartego na kompleksowym badaniu składu aminokwasów i dipeptydów w wieloskładnikowych matrycach rolno-spożywczych i medycznych” spełnia wymagania formalne stawiane tego rodzaju pracom przedstawianym w postępowaniu na stopień naukowy doktora, tzn. ma charakter eksperymentalny i zawiera wszystkie niezbędne rozdziały ułożone w typowej sekwencji. Przedmiotem recenzji jest 136 stronicowe opracowanie, wykonane w oparciu o wyniki badań Autorki. Rozprawa, rozpoczynająca się streszczeniem w języku polskim i angielskim ma strukturę typową dla tego rodzaju opracowań i zawiera 11 rozdziałów wraz z podrozdziałami: wstęp, przegląd literatury, opis celu pracy, charakterystykę użytych materiałów i metod, opis badań i eksperymentów, omówienie wyników i dyskusję

wyników, podsumowanie i wnioski, spis wykresów, spis tabel, wykaz piśmiennictwa. Całość zawiera 46 rysunków, 24 tabele, oraz 166 pozycji literaturowych jednakże nie zawsze prawidłowo cytowanych (np. pozycje 26, 27, 28, 151, 155, 156, 157, 158 nie mają podanych danych źródłowych). Być może użytecznym uzupełnieniem do ww. rozdziałów byłby Wykaz używanych skrótów zawsze pozwalający na sprawne poruszanie się po tekście. Praca nie jest dość starannie przygotowana pod względem redakcyjnym i Autorka nie ustrzegła się pewnych błędów. Choć opracowanie stanowi zwartą całość to nie zawsze napisane jest poprawnie, jasnym i zrozumiałym językiem np. bez unikania powtórzeń omawianych treści. Dodatkowe drobne uwagi i sugestie bądź propozycje zmian (zwykle stylistycznych i dyskusyjnych, nie wpływających na wartość merytoryczną pracy) naniostałam ołówkiem, w egzemplarzu, który otrzymałam do oceny, do ewentualnego wykorzystania przez Autorkę podczas publikowania wyników.

### **Ocena merytoryczna pracy**

Po zapoznaniu się z treścią pracy stwierdzam, że tytuł dysertacji choć został zwięźle sformułowany to nie w pełni adekwatnie do jej treści. Być może w treści pracy nie wybrzmiały w sposób wystarczający deklarowane aspekty innowacyjne badania składu aminokwasów i peptydów oraz zaproponowana kompleksowość badań. Zastrzeżeń zasadniczych nie budzą streszczenia, zarówno wersja w j. polskim jak i wersja w j. angielskim, gdzie Doktorantka przedstawia cel badań jako opracowanie systemu analitycznego, który pozwala na badanie aminokwasów i peptydów oraz jest przeznaczony do poszczególnych, złożonych matryc żywnościowych w aspekcie optymalizacji polegającej na maksymalizacji wydajności, skuteczności lub użyteczności, przy jednoczesnym minimalizowaniu kosztów lub innych negatywnych aspektów. To co jest wartym podkreślenia to dostosowanie systemów badawczych do analizy aminokwasów i peptydów w odpadowych matrycach pochodzących z przemysłu garbarskiego oraz odpadowym kolagenie wołowym i odpadowym kolagenie rybnym oraz surowcach pochodzenia roślinnego. W części pracy dotyczącej przeglądu piśmiennictwa Autorka dokonuje analizy zagadnienie w świetle literatury oraz zapoznaje i wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji. Rozdział 2.5 Wpływ składu matryc na biodostępność aminokwasów i peptydów jest zbędny w aspekcie tematu i celu pracy. Dobór merytoryczny źródeł oraz sposób ich wykorzystania uważam za co do zasady prawidłowy. Jednak Doktorantka nie uniknęła pewnych pomyłek jak np. powtórzenia treści (str. 10 i 11 GC/MS i LC/MS czy str. 12 gdzie omawiano chiralność aminokwasów) i nieścisłości, które z racji pełnionej funkcji recenzenta chciałabym wskazać: czy zboża i rośliny oleiste to nowe i niekonwencjonalne źródła białka; jaka jest różnica między techniką a metodą badawczą; struktura aminokwasów determinuje funkcje i białek i peptydów; które aminokwasy tworzą kompleksy z metalami; jakie prekursory aminokwasów muszą być dostarczane w diecie; które aminokwasy są względnie endogenne; jaki był cel

uwzględnienia miodów w badaniach (dlaczego w oznaczeniach uwzględnia się Pro i jaką metodą tego dokonuje); jakie mamy typy kolagenu; czy ekstrudowanie i hydroliza enzymatyczna to techniki ekstrakcji; jakie są pełnowartościowe białka w grzybach; czy awokado zawiera znaczne ilości skrobi; czy owoce i warzywa mają zdolność do tworzenia stabilnych struktur i interakcji z innymi składnikami odżywczymi; czy grzyby są pełne białek; czy występują procesy tworzenia lub formowania żywności; czym jest pojęcie: inhibitory proteolityczne; w jaki sposób obecność inhibitorów wpływa na jakość białka; AAS to Atomowa Spektrometria Absorpcyjna a nie spektrometria atomowa; proteomika dotyczy białek a nie peptydów; rozdział dotyczący moczu nie wpisuje się w zakres badań technologii żywności i żywienia człowieka; Co oznacza termin interfejs olej/woda; czy możliwe jest produkowanie wyrobów bezglutenowych na bazie zbóż; przy omawianiu techniki FTIR, spektrofotometrii UV-VIS, HPLC, GC brakuje paru przykładów dla składników żywności w tym białek i peptydów.

Tak opracowana część pracy wystarczająco spełnić może swoją funkcję w aspekcie nakreślenia pewnego stanu wiedzy i badań odnośnie problemów badawczych podejmowanych w rozprawie. Aczkolwiek w tej części dysertacji nie wystarczająco wybrzmiało uzasadnienie wyboru matryc żywnościowych w aspekcie podsumowania przeglądu stanu wiedzy i prac w przedmiotowym zakresie. Autorskie podsumowanie stało się bazą do sformułowania założeń badawczych w ocenianej pracy i określenia celów badań.

Oprócz głównego celu jakim było opracowanie: (i) systemu analitycznego, który umożliwi oznaczenie aminokwasów i dipeptydów w wybranych wieloskładnikowych matrycach rolno-spożywczych, medycznych i odpadowych wraz z określonymi metodami przygotowania próbek i kierunku zastosowania wyników; określono dwa cele szczegółowe, które Recenzent uważa za je tożsame stąd podaje je jako jednobrzmiące: (ii) opracowanie zestawu procedur i metod badawczych do monitorowania jakości preparatów białkowych w żywności w aspekcie analizy zawartości aminokwasów w tym oczyszczanie tych preparatów oraz biomasy roślinnej i odpadowych produktów zwierzęcych a następnie identyfikowanie (w celu szczegółowym Autorka pomija jednak zagadnienie związane z peptydami). Dość zaskakujący jest trzeci cel szczegółowy zdefiniowany jako (iii) rozwój techniki w zakresie przenośnych urządzeń lub narzędzi diagnostycznych, które umożliwią szybką i dokładną analizę zawartości aminokwasów w czasie rzeczywistym. Autorka nie porusza tego zagadnienia w rozdziale podsumowanie i wnioski - proszę o ustosunkowanie się do tych zastrzeżeń. Dodatkowe pytanie: czy mąki (rys. 1 ) to novel food oraz jakie produkty białkowe zaliczyć możemy do kategorii novel food.

Materiał i metody zastosowane do badań zostały przedstawione na 27 stronach i są merytorycznie dobrane. Doktorantka do badań wybrała: miody spożywcze, kolagen spożywczy, grzyby spożywcze, surowce roślinne (papryka i pomidory), suszoną część

naziemną pszenicy, odpadowy kolagen rybi, odpadowy kolagen wołowy, strużyny garbarskie, żywność typu „novel food”, mocz ludzki. Uzupelnienia wymagają miejsca pochodzenia, daty zbioru, nazwy handlowe dla matryc żywnościowych oraz kryteria włączenia i wykluczenia, ilość osób uczestniczących w badaniu w przypadku moczu. W przypadku miodów zastosowano standardową metodykę zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu. Dla kolagenu spożywczego zaproponowano wstępną hydrolizę kwaśną, która w przypadku rybiego oraz wołowego kolagenu odpadowego była połączona ze wstępnym przygotowaniem odpadowych skór. Podczas wstępnego oczyszczania preparatów z odpadowych surowców kolagenowych wykorzystano filtrację membranową, nanofiltrację, dializę oraz technikę SPE. W przypadku odpadowego kolagenu rybiego i wołowego zastosowano także hydrolizę alkaliczną. Grzyby, paprykę i pomidory, susz pszenicy poddano procesowi liofilizacji. Żywność typu novel foods oraz strużyny garbarskie po zamrożeniu poddawano procesowi hydrolizy. Ważnym aspektem poznawczym proponowanych badań był żmudny proces dotyczący wstępnego przygotowania surowców odpadowych oraz opracowania metod ekstrakcji kwasowej kolagenu. Tą część opracowania uważam za najbardziej wartościową w aspekcie celu pracy oraz zastosowań aplikacyjnych. Jednakże tabele dotyczące wyników metodyki ekstrakcji kolagenu z odpadowych skór rybich oraz skór wołowych – wyniki liczbowe - (metody kwasowe oraz alkaliczna) oraz metod oczyszczania preparatów kolagenowych wraz z omówieniem uzyskanych wyników powinny być umieszczone w Rozdziale Opis Badań i Eksperymentów. W opinii Recenzenta rozdział dotyczący opisu badań i eksperymentów to rozdział dotyczący zastosowanych metodyk badawczych. Na rysunku 12 zabrakło przedstawienia techniki UHPLC-MS/MS jako jednej z wymienionych do zastosowania w pracy. W przedstawionym opisie oznaczenia zawartości wolnej proliny w miodzie uważam za zbędne bowiem Doktorantka nie zaproponował tu żadnego novum w postępowaniu analitycznym (zgodnie z zakresem pracy określonym w tytule jako:” Opracowanie innowacyjnego systemu analitycznego...”) a jedynie wykonała oznaczenia zgodnie ze stosownym Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Podobnie brakuje uzasadnienia dla oznaczeń jakościowych kolagenu w próbkach preparatów kolagenowych (co do zasady preparaty kolagenowe zawierają kolagen; uzasadnione byłyby oznaczenia ilościowe również w kontekście weryfikacji deklaracji producenta lub oceny jakości kolagenowych produktów). W rozdziale zabrakło opisu reakcji derywatywacji (Doktorantka odsyła czytelnika dysertacji do punktu 4.5, którego brakuje w spisie treści). Przy oznaczaniu zawartości aminokwasów w matrycach spożywczych i odpadowych techniką HPLC-FLD Doktorantka dla metody oczyszczania powołuje się na treści zawarte w tabeli 3 dotyczącej jedynie preparatów kolagenowych pochodzących z przemysłu spożywczego (nie komentuje istoty metod oczyszczania dla pozostałych, użytych w badaniu matryc). W tabeli 7 należałoby oddzielnie podać dane dla aminokwasów białkowych i niebiałkowych oraz dipeptydów, dodać kolumnę ze stosowanymi skrótami, w dodatkowej kolumnie uzupełnić informację o aktywności

biologicznej. Takie działanie uporządkowałoby chaotycznie zaprezentowane dane i uczyniłoby je bardziej czytelnymi i zrozumiałymi. Tutaj pojawia się też pojawia się pytanie o kryterium wyboru do badań dwóch zaproponowanych dipeptydów. Dodatkowo uzupełnienia szczegółów wymaga przeprowadzona analiza statystyczna wyników szczególnie w aspekcie porównania wyników oznaczeń.

W najobszerniejszym (37 str.) rozdziale dysertacji pt. „Wyniki Badań” Doktorantka opisała rezultaty poszczególnych badań tj. oznaczeń zawartości proliny (zastrzeżenia przedstawiono wyżej); identyfikacji kolagenu (tutaj zabrakło prawidłowego, nie pozostawiającego wątpliwości opisu czego dotyczą tytułu dla rysunków 19-22); oznaczeń zawartości hydroksyproliny w odpadowym kolagenie wołowym techniką UV-VIS z uwzględnieniem różnych technik oczyszczania próbki (filtracja w tym z wykorzystaniem membran, nanofiltracja, dializa, SPE; opisu wymagają skróty KK1-9); oznaczeń zawartości aminokwasów w kolagenie spożywczym techniką HPLC-FLD i HPLC-DAD (wyjaśnienia wymaga termin surowiec kolagenowy P1-2F); oznaczeń zawartości aminokwasów w odpadowym kolagenie wołowym techniką HPLC-FLD (zabrakło legendy dla symboli K 1-4) wraz z porównaniem wyników dla kolagenu spożywczego; oznaczeń zawartości aminokwasów w odpadowym kolagenie rybim techniką HPLC-FLD (zabrakło legendy dla symboli R 1-9) wraz z porównaniem wyników dla kolagenu spożywczego; porównania wyników oznaczeń dla odpadowego kolagenu wołowego i odpadowego kolagenu rybiego – HPLC-FLD); oznaczeń zawartości aminokwasów w strużynach garbarskich techniką HPLC-FLD (zabrakło legendy dla symboli S1-6); oznaczeń zawartości aminokwasów w grzybach jadalnych techniką HPLC-FLD (zabrakło legendy dla symboli B 1-2, C 3-4, E 6-7, F 8-9 oraz opisanie w części metodycznej procesu dezaktywacji); oznaczeń zawartości aminokwasów w białku zbożowym (w rozdziale Dyskusja Doktorantka określa źródło białka zbożowego jako śruta zbożowa) techniką GC-MS (zabrakło objaśnienia co do istoty białka zbożowego, legendy dla symboli Z 1-4 oraz komentarza do treści tabeli 15). Kolejno wykonywała oznaczenia techniką GC-MS zawartości aminokwasów i dipeptydów w produktach odpadowych, owocowo-warzywnych i medycznych tj. odpadowym kolagenie wołowym (zabrakło legendy dla symboli KK1-9), pomidorach (zabrakło legendy dla symboli P1 1-3 oraz S1 1-3), papryce (zabrakło legendy dla symboli M/G/R/B – 0-1-4) i moczu (zabrakło legendy dla symboli M 1-3). Następnie Doktorantka porównała wyniki oznaczeń zawartości aminokwasów w odpadowym kolagenie wołowym (HPLC-FLD) i strużynach garbarskich (GC-MS) wykazując przewagę techniki HPLC\_FLD nad techniką GC-MS. W ostatnim etapie pracy zastosowała technikę UHPLC/MS/MS do oznaczeń aminokwasów w odżywkach proteinowych, mące ze świerszczy, kasztanów i ciecierzycy, suszu z części zielonych pszenicy (zabrakło legendy dla symboli Z 1-6 oraz 1-3). Badania dotyczące oznaczeń zawartości aminokwasów w moczu ludzkim uważam, że nie spełniają kryterium merytorycznego odnośnie wpisywania się w przedmiot zainteresowań naukowych w

zakresie dyscypliny technologia żywności i żywienia i stąd powinny być w pracy dysercyjnej pominięte.

Podsumowanie osiągniętych wyników Doktorantka zawarła w 14 stronicowym rozdziale Dyskusja. Dyskusję o charakterze przyczynowo-skutkowym dotyczącą otrzymanych wyników Doktorantka starała się prowadzić konfrontując wyniki własnych badań z pewnymi doniesieniami innych autorów. W niektórych przypadkach brak jest pogłębionej dyskusji lub własnych przemyśleń Autorki. Do najważniejszych efektów przeprowadzonej dyskusji zaliczam stwierdzenia, że: wyniki badań otrzymane po zastosowaniu różnych technik badania zawartości aminokwasów w matrycach odpadowych (odpadowym kolagenie wołowym oraz strużynach garbarskich) wskazały, iż technika GC-MS jest mniej selektywna a także, że metodyka badania zawartości aminokwasów techniką chromatografii gazowej w matrycach odpadowych wymaga dopracowania w procesie oczyszczania próbki. Co więcej wykazano, że do analizy odpadowej biomasy zwierzęcej techniką analityczną o najwyższej precyzji jest HPLC-FLD. Dodatkowo analiza składu aminokwasowego wymagała przeprowadzenia procesów hydrolizy. Doktorantka zaproponowała zastosowanie zamiast mocnych kwasów, takich jak HCl, wykorzystanie kwasu glikolowego oraz innych kwasów, takich jak kwas cytrynowy, askorbinowy i migdałowy – w połączeniu z hydrolizą enzymatyczną. W aspekcie tez i stwierdzeń przedstawionych w rozdziale Dyskusja dodatkowo chciałabym poprosić Doktorantkę o rozważenie następujących zagadnień podczas dyskusji: (i) jakie dane wskazują, że „produkcja alternatywnych źródeł białka jest w fazie intensywnego rozwoju” oraz (ii) jakie dane wskazują, że „analizy z wykorzystaniem LC-MS/MS charakteryzują się większą czułością, specyficznością, szybkością oraz zdolnością identyfikacji nowych aminokwasów, co czyni go najbardziej zaawansowanym narzędziem do analizy aminokwasów”.

W zamykającym rozprawę 10-punktowym rozdziale Podsumowanie i Wnioski Doktorantka zawarła główne rezultaty swojej pracy (ze względu na ich charakter być może powinien on być zatytułowany Stwierdzenia i wnioski). Jednakże w treści rozdziału nie podniesiono zakresu realizacji celu szczegółowego 3. Otrzymane rezultaty potwierdzają zarówno poznawczy charakter jak i potencjał aplikacyjny dysertacji. Jako novum badawcze można wskazać opracowanie sposobu postępowanie metodycznego w szczególności dla badań zawartości aminokwasów w materiałach odpadowych tj. w odpadowym kolagenie rybnym, wołowym i strużynach garbarskich. W efekcie nastąpiło rozszerzenie oferty badawczo-laboratoryjnej Sieci Badawczej Łukasiewicz – Łódzkiego Instytutu Technologicznego opracowano instrukcję pomocniczą pozwalającą na oczyszczenie próbek, a następnie na badanie zawartości wolnych aminokwasów z dużą precyzją i dokładnością (IP – 1,1 - Instrukcja pomocnicza oczyszczania próbek). Dodatkowo opracowano dwie procedury badawcze: (i) Procedura Badawcza – PB-6,0 - Oznaczenie zawartości aminokwasów w żywności metodą chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym (HPLC-FLD); (ii) Procedura Badawcza – PB-6,1 -

Oznaczenie zawartości aminokwasów w biomasie metodą chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC-MS).

### **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr inż. Magdaleny Lasoń-Rydel pt.: „Opracowanie innowacyjnego systemu analitycznego opartego na kompleksowym badaniu składu aminokwasów i dipeptydów w wieloskładnikowych matrycach rolno-spożywczych i medycznych” stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu badawczego spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim, jak również stanowi osiągnięcie naukowe odpowiadające wymaganiom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm).

Wnioskuje do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Politechniki Łódzkiej w Łodzi o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Lasoń-Rydel i dopuszczenie go do kolejnych etapów przewidzianych w postępowaniu doktorskim.

Halina Jonec