

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Łuciuk zatytułowanej
Zastosowania chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas
do uwierzytelnianiu ryb i produktów rybnych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Łuciuk powstała w wyniku badań, prowadzonych bezpośrednio pod kierownictwem naukowym prof. dr hab. Emilii Fornal pełniącej funkcję promotorki. Badania zrealizowano w Uniwersytecie Medycznym w Lublinie w ramach projektu pt.: „*Poszukiwanie markerów metabolicznych i peptydomicznych składników żywności pochodzenia roślinnego i zwierzęcego opornych na procesy technologiczne*” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Ocena wyboru tematyki badawczej

Tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej jest bardzo aktualna i dotyczy badań nad poszukiwaniem markerów peptydowych do uwierzytelnianiu ryb i produktów rybnych. Zafalszowanie żywności stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Dodawanie nielegalnych substancji, takich jak barwniki, konserwanty lub substancje zwieszające ich wartość odżywczą, może prowadzić do chorób i reakcji alergicznych u konsumentów. Ponadto, takie produkty często nie spełniają standardów bezpieczeństwa żywności, co zwiększa ryzyko zatrucia pokarmowego. Falszowanie żywności to złożony problem, który ma negatywny wpływ na zdrowie i życie konsumentów, gospodarkę i zaufanie konsumentów. Polega ono na celowym i nieetycznym ingerowaniu w produkty spożywcze w celu osiągnięcia korzyści ekonomicznych poprzez dodawanie substancji niższej jakości. Dlatego ważne jest, aby prowadzić działania mające na celu zwalczanie tego zjawiska i promować uczciwe i bezpieczne praktyki w produkcji i dystrybucji żywności. W miarę jak techniki falszowania stają się bardziej zaawansowane, konieczne jest rozwijanie również zaawansowanych metod identyfikacji do zwalczania takich procederów. Uważam, że problem związany z zafalszowaniem żywności jest bardzo aktualny i wymaga poszukiwania czułych, niezawodnych i dokładnych metod analitycznych, które mogą stanowić cenne narzędzie do uwierzytelniania np. gatunków ryb i pomoc w wykrywaniu białek roślinnych dodawanych do produktów rybnych. To właśnie tymi zagadnieniami zajęła się Pani mgr Anna Łuciuk w swojej rozprawie doktorskiej proponując wykorzystanie chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem mas o wysokiej rozdzielczości

(LC-QTOF-MS) do poszukiwania i identyfikacji markerów peptydowych różnicujących gatunki ryb.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Anny Łuciuk została przygotowana w języku angielskim i liczy 181 stron, składa się z części literaturowej oraz doświadczanej. Rozpoczyna ją krótkie wprowadzenie uzasadniające konieczność podjęcia tematyki badawczej ukierunkowanej na wykorzystanie chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas w uwierzytelnianiu żywności, w tym ryb i produktów rybnych. Część eksperymentalna rozpoczyna się od przedstawienia celu, a następnie omówione są wykorzystane metody, zestawienie uzyskanych podczas badań wyników, podsumowanie i dyskusję wyników oraz spis rysunków, tabel i bibliografię (209 pozycji literaturowych).

Część teoretyczna (licząca 69 stron) składa się z trzech głównych rozdziałów opisujących uwierzytelnianie żywności, ryby jako jedno z głównych źródeł składników odżywczych oraz proteomikę. Doktorantka w pierwszych dwóch rozdziałach wyjaśnia definicję, cel i wyzwania związane z uwierzytelnianiem żywności oraz regulacje w zakresie uwierzytelniania żywności ze szczególnym uwzględnieniem ryb. W ostatniej części tego rozdziału opisano metody analityczne najczęściej stosowane w uwierzytelnianiu żywności i poparto je przykładami z najnowszych publikacji. W kolejnym rozdziale Pani mgr Anna Łuciuk opisała właściwości żywności funkcjonalnej oraz omówiła korzyści zdrowotne wynikające ze spożycia ryb i produktów rybnych. Bardzo istotny, z punktu widzenia zdrowia konsumentów, jest rozdział 2.2 i 2.3, gdzie wspomniano o negatywnym aspekcie, jakim są potencjalne alergie wywołane poprzez spożycie ryb, które mogą być wywołane obecnością rodziny białek enolazy 47-50 kDa i aldolazy 40 kDa oraz witelogeniny i tropomiozyny. To bardzo dobrze przygotowany materiał, który pozwala uzmysłwić skalę zagrożenia jakie niesie za sobą spożywanie ryb, oczywiście uwzględniając również ich wartości odżywcze. W kolejnym rozdziale omówiono wyzwania związane z uwierzytelnianiem ryb oraz opisano najnowsze osiągnięcia w zakresie metod i narzędzi analitycznych stosowanych do uwierzytelniania gatunków ryb. W ostatnim rozdziale części teoretycznej Doktorantka wprowadza czytającego w świat technik -omicznych (proteomika), gdzie bardzo skrupulatnie opisała również wylaniającą się dyscyplinę, jaką jest foodomika. Ostatni rozdział części teoretycznej kończy się zastosowaniami proteomiki do uwierzytelniania gatunków ryb z przykładami rezultatów otrzymanych przez innych badaczy. Ta część jest bardzo dobrze przygotowana i podkreśla obszerną wiedzę Doktorantki w zakresie poruszanej tematyki.

Na początku części eksperymentalnej Doktorantka zamieściła cel pracy, który sformułowała bardzo szczegółowo z podaniem zakresu prowadzonych badań, który dotyczył nieukierunkowanej analizy proteomicznej z wykorzystaniem spektrometrii mas o wysokiej rozdzielczości. W szczególności badania koncentrują się na poszukiwaniu i identyfikacji markerów różnicujących gatunki ryb, które są specyficzne dla gatunków ryb, w tym markerów odpornych na procesy obróbki cieplnej. W tym miejscu pragnę podkreślić,

że realizacja założonego celu głównego i zdań badawczych wymagała ogromnego nakładu pracy Doktorantki poczynając od właściwie zaplanowanych i wykonanych eksperymentów do dojrzałej i wnikliwej interpretacji wyników. Doceniam ogrom tej żmudnej pracy, poświęconego czasu i wysiłku.

Do badań Pani mgr Anna Łuciuk wybrała jako materiał badawczy pięć różnych gatunków ryb: morszczuk (*Merluccius merluccius*) i mintaj (*Gadus chalcogrammus*), panga (*Pangasius bocourti*), sola (*Solea solea*) i limanda (*Limanda limanda*) (uzasadniając swój wybór w odniesieniu do zafalszowań na polskim rynku) oraz produktów z różnych gatunków ryb. Z ogromną starannością i posiadaną wiedzą opracowała metodyki przygotowania próbek poprzez trawienie białek ryb mrożonych oraz poddanych obróbce termicznej i pieczeniu. Korzystając z wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z wysokorozdzielczym spektrometrem masowym typu LC-QTOF-MS, zarówno w trybie MS, jak i MS/MS Doktorantka przeprowadziła kompleksową analizę proteomiczną. Wyniki uzyskane w wyniku tych badań z wykorzystaniem specjalistycznego oprogramowania do analiz proteomicznych oraz narzędzi chemometrycznych umożliwiły identyfikację wielu markerów peptydomicznych, które zachowały swoje właściwości nawet po obróbce termicznej. Rezultaty badań umożliwiły zidentyfikowanie 22 peptydów charakterystycznych dla mintaja oraz 17 peptydów charakterystycznych dla morszczuka. W przypadku analizy pangii, soli i limandy Doktorantka zastosowała odpowiednie modele statystyczne, takie jak PCA i OPLS-DA, które doprowadziły do stworzenia bazy danych markerów peptydomicznych charakteryzujących każdy z tych trzech gatunków ryb. Analizy próbek testowych potwierdziły skuteczność opracowanych modeli statystycznych oraz poprawne działanie opracowanych baz danych.

Dokonując oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej i dyskusji wyników za najbardziej wartościowe osiągnięcie w przedstawionej pracy uznaję:

- opracowaną procedurę uwierzytelniania gatunków ryb morszczuka i mintaja (39 markerów peptydowych odpornych na ciepło, w tym 22 peptydy charakterystyczne dla mintaja i 17 peptydów specyficznych dla morszczuka) na podstawie wyników analizy proteomicznej i jej zweryfikowanie w odniesieniu do próbek rzeczywistych i produktów rybnych,
- wytypowanie peptydu ALTDAETATFLK jako markera peptydomicznego i markera do monitorowania czynnika alergennego (morszczuk i inne ryby z rodziny *Merluccius*),
- uzyskanie modelu predykcyjnego dla uwierzytelniania soli, pangii i limady uzyskane na podstawie modelowania chemometrycznego z wykorzystaniem PCA i OPLS-DA,

Wymienione przeze mnie osiągnięcia naukowe uzyskane w wyniku prowadzonych badań z powodzeniem mogą być zastosowane do uwierzytelniania żywności celem odróżnienia produktu oryginalnego od zafalszowanego. Dokonując oceny części doświadczalnej należy stwierdzić, że Doktorantka posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia prac eksperymentalnych oraz interpretacji uzyskanych wyników zaplanowanych i wykonanych różnymi metodami badawczymi.

Uwagi szczegółowe

W obowiązku recenzenta, który poza podkreśleniem walorów pracy ma także obowiązek wskazania pojawiających się błędów i niedociągnięć. W rozprawie doktorskiej zauważyłam pewne wątpliwe sformułowania oraz drobne uchybienia czy błędy redakcyjne. Praca Pani mgr Anny Łuciuk jest przygotowana bardzo starannie, układ pracy logicznie i przejrzysto zaplanowany. Szata graficzna bardzo staranna a opisy czytelne. Dlatego też, pracę czyta się bardzo dobrze z dużym zainteresowaniem. Przytoczone uwagi nie mają w żadnej mierze negatywnego charakteru i nie wpływają na moją pozytywną ocenę oraz jakość wykonywanych przez Doktorantkę badań, a jedynie stanowią podstawę do dyskusji. Proszę więc o wyjaśnienie:

- na jakiej podstawie dokonano wyboru sorbentu do ekstrakcji do fazy stałej? Jaka powtarzalność i efektywność uzyskano dla tej ekstrakcji (str. 76),
- czy próbki po ekstrakcji z wykorzystaniem Sep-Pak C18 wymagały filtrowania? Jeżeli tak, to jaki filtr zastosowano?
- jakie cechy różnicujące wybrano do zbudowania bazy danych cech peptydomicznych? Czy istnieje szansa na wykorzystanie PAA i PLS w laboratoriach sprawujących kontrolę nad zafalszowaniami żywności?
- jaka część przeprowadzonych badań może być wykorzystana w rutynowych analizach?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że Pani mgr Anna Łuciuk wykazała wiedzą się w tematyce będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić ogrom pracy doświadczalnej jaką wykonała Doktorantka oraz fakt, że wyniki tej pracy mają charakter aplikacyjny. Oceniając rozprawę doktorską z pełnym przekonaniem można stwierdzić, że dotyczy ona aktualnej i ważnej tematyki, zarówno pod względem poznawczym, jak i praktycznym oraz wnosi elementy nowości w zakresie poszukiwania i identyfikacji specyficznych markerów, które różnicują gatunki ryb z wykorzystaniem chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas o wysokiej rozdzielczości do nieukierunkowanej analizy proteomicznej.

Uważam, że praca Pani mgr Anny Łuciuk zatytułowana *Zastosowania chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas do uwierzytelniania ryb i produktów rybnych* spełnia kryteria określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2023 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 z późniejszymi zmianami) stawiane pracom doktorskim, dlatego też wnoszę do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Renata Gadziś-Kopciuk
Toruń, dnia 25 października 2023 r.

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE ROZPRAWY PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszym zwracam się do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Łuciuk zatytułowanej *Zastosowania chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas do uwierzytelnianiu ryb i produktów rybnych*

Uzasadnienie:

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykazuje wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Doktorantka wykazała się doskonałymi kompetencjami w obszarze chemii żywności, chemii analitycznej i biologii oraz w wykorzystywaniu zaawansowanych technik instrumentalnych do przeprowadzenia kompleksowej, nieukierunkowanej analizy proteomicznej. Jej umiejętności w zakresie badań dotyczących poszukiwania markerów peptydowych różnicujących gatunki ryb w połączeniu z narzędziami chemometrycznymi są godne uznania. Jestem również pod wrażeniem otwartości Doktorantki na nauki biologiczne, co świadczy o jej wszechstronności i elastyczności w podejściu do problematyki badawczej. Należy docenić ogromną wartość aplikacyjną uzyskanych wyników w ramach tej pracy. Rezultaty te mogą znaleźć zastosowanie w praktyce, co czyni rozprawę doktorską jeszcze bardziej wartościową. Dodatkowo, warto podkreślić aktywny udział Doktorantki w konferencjach naukowych, co świadczy o jej zaangażowaniu i chęci dzielenia się wiedzą z innymi naukowcami.

Na podstawie powyższych argumentów, zdecydowanie popieram wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Łuciuk. Jej praca jest godna uznania i stanowi znaczący wkład w rozwijanie wiedzy naukowej w zakresie chemii żywności.

Renata Gadzała-Kopciuch
Toruń, dnia 25 października 2023 r.