

Prof. dr hab. inż. Henryk Jeleń
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Ul. Wojska Polskiego 31, 60-624-Poznań
Tel: 061-8487273
E-mail: henrykj@up.poznan.pl

Poznań, 29 sierpnia 2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Łuciuk pt. „Zastosowania chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas do uwierzytelniania ryb i produktów rybnych” napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Emilii Fornal

Badania w ramach pracy zostały wykonane w Uniwersytecie Medycznym w Lublinie w ramach projektu „Poszukiwanie markerów metabolicznych i peptydomicznych składników żywności pochodzenia roślinnego i zwierzęcego opornych na procesy technologiczne” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (Nr projektu 2017/25/B/NZ9/02000). Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma tradycyjną formę maszynopisu i odpowiednią dla tej formy strukturę. Została napisana w języku angielskim.

Dobór tematyki badań przedstawionych w rozprawie jest wypadkową jednego z istotniejszych problemów w obrocie żywnością a mianowicie zafałszowań żywności, ściślej pochodzenia gatunkowego mięsa wybranych ryb, oraz narzędzi analitycznych stosowanych w badaniach prowadzonych w zespole prowadzonym przez Panią Promotor – prof. Emilię Fornal. Technika wykorzystywana w badaniu autentyczności żywności, głównie pochodzenia zwierzęcego, której przydatność badano w niniejszej pracy doktorskiej jest proteomika.

Problem zafałszowań żywności ma wielowiekową historię, natomiast już od ponad 200 lat istnieje w świadomości konsumentów i organów kontrolnych – warto przytoczyć tutaj pierwszą o dużym oddźwięku społecznym monografię na temat zafałszowań żywności - „A Treatise on Adulterations of Food and Culinary Poisons” autorstwa Fredricka Accuma, wydaną w 1820 roku, czy tzw. Food Adulteration Act z 1860 roku. W obecnej rzeczywistości przy globalizacji produkcji i handlu zafałszowania żywności są jednym z głównych problemów rynku żywnościowego, natomiast dostępność nowoczesnych metod i narzędzi analitycznych umożliwia coraz skuteczniejszą walkę z tym zjawiskiem. Wybór tematu pracy uważam za bardzo istotny z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności. Skupienie się w badaniach nad autentycznością ryb uważam za trafne i celowe, biorąc pod uwagę ich istotną

rolę w żywieniu człowieka, dużą rozpiętość cenową ryb różnych gatunków i łatwość fałszowania, szczególnie ryb poddanych obróbce termicznej.

Praca obejmuje 181 stron maszynopisu, który został podzielony na część literaturową poświęconą ogólnie zagadnieniu zafałszowań żywności (18 stron), rybom jako składnikowi diety, metodom wykorzystywanym w badaniu ich autentyczności (16 stron) oraz proteomice (27 stron). Kolejną częścią pracy stanowi cel badań, sekcja materiały i metody (8 stron), oraz część wynikowa, podzielona na wyniki badań różnicowania morskazuka i mintaja (47 stron) oraz soli, pangii i zimnicy (limandy) (24 strony). Następnym rozdziałem jest podsumowanie i dyskusja (8 stron), po którym umieszczono spis rycin i tabel. Całość kończy spis literatury obejmujący 209 pozycji.

Część literaturowa jest napisana jasno i przejrzysto. Pierwszy rozdział poświęcony jest problematyce zafałszowań żywności. Zagadnienie to obejmuje szereg aspektów, takich jak identyfikacja gatunkowa, identyfikacja pochodzenia botanicznego, regionalnego, surowcowego, rozróżnianie metod produkcji (ekologiczna/wielkotowarowa), procesów technologicznych, czy wykrywania organizmów GMO. Przedstawiono w niej przegląd technik stosowanych najczęściej w wykrywaniu zafałszowań, w skrócie opisując ideę, zasady metod i główne aplikacje. Najwięcej miejsca poświęcono metodom chromatograficznym i sprzężonym oraz technikom molekularnym – dwóm podejściom najczęściej wykorzystywanym w badaniu autentyczności żywności (patrzac przez pryzmat liczby publikacji, a nie przez pryzmat rutynowych narzędzi kontroli).

Kolejny rozdział części literaturowej poświęcony jest rybom jako składnikowi diety i korzyściom zdrowotnym wynikającym z ich konsumpcji. Autorka zwraca uwagę także na problem alergienności ryb, które klasyfikowane są jako źródło alergii typu I, a głównymi białkami alergizującym są β -parvalbuminy. Niezależnie od przeglądu technik analitycznych stosowanych w detekcji zafałszowań żywności, omówionych na stronach 11-26 autorka w rozdziale 2.5 przedstawia przegląd metod analitycznych wykorzystywanych do badań zafałszowań ryb. Omówiono szczegółowo techniki molekularne, oparte na analizie DNA, co wynika z powszechności ich stosowania w wykrywaniu zafałszowań ryb. Przedstawiono także skrótoowo techniki MALDI, QTOFMS, ICP-MS, NMR, E-nosy, spektroskopię Ramana opierając się na aplikacjach dotyczących ryb.

Bardzo obszerny (strony 42-69) i dobrze napisany jest ostatni rozdział części literaturowej poświęcony proteomice, zarówno w ujęciu teoretycznym, jak i obejmującym wykorzystanie tej techniki w badaniu autentyczności mięsa ryb. Przedstawiono w skrócie podstawy proteomiki, specyfikę różnych podejść w analizie proteomu, aspekty proteomiki jakościowej, ilościowej/dyskryminacyjnej i funkcjonalnej, przywiązując szczególną wagę do metod ilościowych. Omówiono także główne podejścia – strategię w badaniach proteomicznych

(top-down, bottom-up, shotgun). Szczegółowy opis dotyczący wariantów i podejść w tych badaniach, których złożoność ilustruje Ryc. 10 jest pomocnym materiałem dla czytelnika a cała część dotycząca proteomiki mogłaby być bardzo przydatnym materiałem dydaktycznym. W wyczerpujący sposób przedstawiono techniki analizy proteomu wykorzystywane w badaniu bezpieczeństwa, w tym autentyczności ryb i owoców morza. Skupiono się na pracach dotyczących podejścia „bottom-up”, a także analizie celowanej. O ile opis wariantów MS i postępowań analitycznych jest bardzo obszerny i wyczerpujący, to przydałby się rozdział opisujący identyfikację białek za pomocą MS z użyciem baz danych i specyfikę tego typu analiz z wykorzystaniem widm HRMS i MS/MS.

Uwagi dotyczące części literaturowej:

- *W części literaturowej metodom analitycznym wykrywania zafałszowań poświęcono 2 rozdziały – 1.2 oraz 2.5. By uniknąć wrażenia powtarzania niektórych informacji można było się zastanowić nad potraktowaniem rozdziału 1.2 bardziej skrótowo, bez odniesień literaturowych (aplikacje dotyczące oliwy, miodów czy herbaty sprawiają wrażenie dość przypadkowych w kontekście pracy) i ująć techniki wykrywania zafałszowań (w tym te nieużywane do badania autentyczności ryb) w formie tabeli lub schematu.*
- *W oparciu o dane literaturowe [publikacja 13, obejmująca lata 1980-2014] autorka podaje, że ryby i owoce morza stanowią najczęściej fałszowaną grupę produktów spożywczych (32%) znacznie przekraczającą drugą w kolejności grupę olejów i tłuszczów (11%), napoje alkoholowe (8%), czy produkty mięsne (7%). Informacja ta była dla mnie dość dużym zaskoczeniem, biorąc pod uwagę dominujące w większości artykułów przeglądowych i baz danych, takie produkty jak oliwa z oliwek, produkty mleczne, miód, ekstrakty wanilii, szafran, kawa, czy soki owocowe. To samo źródło [13] podaje także inne zestawienia, z dominującymi pod względem liczby zafałszowań olejami, substancjami aromatycznymi, przyprawami, sokami, w zależności od tego z jakich materiałów źródłowych powyższe zestawienia zostały utworzone (Ryc. 2-3, tamże). Przytoczony wykres (Ryc. 2 pracy) dotyczy tylko tzw. przypadków EMA (ang. Economically Motivated Adulteration). Zamieszczenie tej informacji w opisie ryciny wyjaśniłoby moje wątpliwości. Jak widać w powyższej publikacji klasyfikacja najpowszechniej fałszowanych produktów jest wysoce zależna od rodzaju danych użytych do tworzenia tego typu zestawień (doniesienia prasowe, artykuły naukowe, instytucjonalne bazy danych itp.).*
- *Nie mogę się zgodzić ze stwierdzeniem na str. 24 („...application of mass spectrometry has become increasingly popular (to prawda) and currently it is probably the most often used detector coupled with HPLC in food research (chcielibyśmy, ale niestety to nieprawda).*
- *Na stronie 68, wiersz 11 autorka pisze „...was based on the Selected Ion Monitoring (SRM)...”. Skrót, jak i dalsza część zdania odnosi się do analizy MS/MS (Single Reaction Monitoring). Termin Selected Ion Monitoring (SIM) z reguły używany jest do trybu pracy pojedynczego kwadrupola, gdzie monitorowany jest albo pojedynczy (Single) albo wybrane (Selected) jony.*

Ryby będące obiektem badań podzielono na dwie grupy – morszczuk i (dwukrotnie tańszy) mintaj, oraz sola, panga (10-krotnie tańsza od soli) i zimnica (limanda, 7-krotnie tańsza od soli). Badano także paluszki rybne o różnym składzie/proporcjach mintaja i morszczuka. Analizowano mięso ryb surowych, jak i poddanych procesowi obróbki termicznej, a także mieszaniny zawierające 5% mięsa zimnicy w soli i odwrotnie. Wybór materiału do badań i sposób jego przygotowania (obróbki) uważam za trafny.

Tok postępowania analitycznego przy poszukiwaniu unikalnych dla danego gatunku peptydów opierał się, po selekcji związków (przy tolerancji masy 5ppm, 90% zgodności stosunku izotopów i 0.2 min tolerancji czasu retencji), na ich profilowaniu. Dla każdej z grup próbek tylko peptydy obecne we wszystkich próbkach były brane pod uwagę. Różnicowanie odbywało się na podstawie ich unikalności oraz krotności (intensywności pików).

Identyfikacja białek i peptydów była prowadzona w oparciu o przeszukiwanie baz proteomicznych, głównie NCBI, a także wykorzystując dane MS/MS, po trawieniu trypsyną. Modele PCS, OPLS-DA w drugiej części badań zostały walidowane z określeniem parametrów R2 (dotyczącego klasyfikacji) oraz Q2 (dotyczącego predykcji). Zarówno proces analityczny, jak i obróbka wyników były typowe dla tego typu analiz.

Część wynikowa pracy podzielona została na dwa rozdziały – pierwszy poświęcony różnicowaniu mięsa mintaja od morszczuka, drugi - różnicowaniu mięsa soli, pangi i zimnicy.

Identyfikacja białek mięsa mintaja i morszczuka w oparciu o bazę danych NCBI z użyciem oprogramowania Spectrum Mill MS Proteomic Workbench (Agilent) z uwagi na małą liczbę rekordów była ograniczona. Dla surowego i gotowanego morszczuka zidentyfikowano po 5 białek, głównie parvalbuminy. Dla surowego i gotowanego mintaja zidentyfikowano po 12 białek, wśród których dominowały miozyny. Co ciekawe pokrycie sekwencji dla analizowanych białek w odniesieniu do danych NCBI było znacznie większe dla białek mintaja niż morszczuka.

W następnej kolejności zidentyfikowane białka i przypisane im peptydy przebadano pod kątem ich przydatności do identyfikacji poszczególnych gatunków ryb. Z uwagi na małą liczbę zidentyfikowanych białek skupiono się na peptydach jako potencjalnych markerach różnicujących badane gatunki. Analiza peptydów wykazała, że można spośród nich zidentyfikować te, które pozwalają na zróżnicowanie morszczuka i mintaja, zarówno surowych jak i poddanych obróbce cieplnej (gotowanych) (Tabela 6). Co ciekawe zidentyfikowano około 10x więcej peptydów charakterystycznych dla mintaja, a nieobecnych w mięsie morszczuka. Wykryto 111 peptydów specyficznych dla mintaja, opierając się na najbardziej intensywnych widmach MS/MS o przyporządkowaniu co najmniej 70%.

W celu zwiększenia liczby zidentyfikowanych peptydów przeszukano także bazę danych SwissProt dla kręgowców zawierającą 85000 rekordów, posługując się tym samym co w

poprzednim wypadku oprogramowaniem. Wg powyższej bazy danych zidentyfikowano 35 charakterystycznych peptydów dla morszczuka oraz 8 dla mintaja o łańcuchach od kilku do ponad 60 aminokwasów i masach monoizotopowych od 710.3318 Da do 6633.443Da, zidentyfikowanych z dużym „prawdopodobieństwem” (SPI, scored peak intensity) – z reguły powyżej 80%. Przeszukano także pod kątem identyfikacji otrzymanych peptydów 6 dodatkowych baz danych proteomicznych NCBI (z danymi dla mięsa szczura, wołowiny, wieprzowiny, kurczaka, królika oraz indyka), identyfikując w nich 41 peptydów dla surowego i gotowanego morszczuka, oraz 18 dla surowego i gotowanego mintaja. 9 peptydów było charakterystycznych dla zarówno surowego, jak i gotowanego morszczuka, a 5 dla surowego, a także gotowanego mintaja. Poprawność identyfikacji związków prowadzonej z użyciem oprogramowania Spectrum Mill MS Proteomic Workench weryfikowano z użyciem oprogramowania MassHunter Profinder, które umożliwia grupową obróbkę danych chromatograficznych i spektralnych (MS), wizualizację i możliwość manualnej kontroli uzyskanych wyników. Rozdział 6.3 dotyczący weryfikacji zidentyfikowanych peptydów za pomocą oprogramowania Mass Hunter jest bardzo istotny, pokazując złożoność procesu identyfikacji peptydów opartej na dokładnym pomiarze masy jonów monoizotopowych (HRMS), ładunków i rozkładu izotopów porównując parametry z teoretycznymi. Weryfikacja tożsamości peptydów prowadzona za pomocą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) pozwala na prześledzenie fragmentacji peptydów w oparciu o generowane charakterystyczne jony po kolizjach CID. Dane obrazujące peptydy zidentyfikowane w oparciu o poszczególne bazy danych obrazują tabele 6 – 10. Po weryfikacji danych ostatecznie wyselekcjonowano 22 peptydy dla mięsa mintaja oraz 18 dla morszczuka dyskriminujące te gatunki i stabilne termicznie (Tabela 12). Jest to bardzo wartościowe osiągnięcie pracy. Dodatkowo dla morszczuka zidentyfikowano Parvalbuminę beta 2, o silnych właściwościach alergizujących, a w jej obrębie peptyd o sekwencji ALTDAETATFLK, którego tożsamość potwierdzono z wykorzystaniem algorytmu BLAST. Zidentyfikowane dla morszczuka i mintaja peptydy wykorzystano z powodzeniem do badania autentyczności paluszków rybnych potwierdzając ich przydatność do identyfikacji pochodzenia surowcowego produktów. Na użytek rutynowych badań stworzono także bibliotekę własną PCDL w ramach oprogramowania MassHunter. Badania nad wyselekcjonowaniem peptydów pozwalających na rozróżnienie mięsa morszczuka od mintaja, także poddanych obróbce termicznej zostały rzetelnie przeprowadzone, wykorzystano dostępne narzędzia analityczne w postaci spektrometru z analizatorami QToF co pozwoliło na weryfikację wyników w oparciu o zarówno spektrometrię mas wysokiej rozdzielczości, jak i widma fragmentacyjne. Identyfikację oparto na dostępnych bazach danych, a wyselekcjonowane peptydy stanowią dobrze udokumentowane markery autentyczności pochodzenia mięsa morszczuka i mintaja.

Kolejnym etapem pracy było znalezienie markerów peptydowych różnicujących mięso soli, pangii oraz zimnicy - surowych, a także poddanych obróbce cieplnej. Zastosowano podobnie jak w poprzednim rozdziale podejście bottom-up po trawieniu trypsyną, natomiast zmieniono sposób obróbki danych. Z uwagi na małą liczbę białek w bazie danych NCBI przede wszystkim dla pangii – 267 i zimnicy – 226 (dla soli liczba białek wynosiła 1440) zastosowano odmienne podejście, w którym wyniki analizy proteomicznej traktowane są jako „cechy” (*ang. features*), wobec których zastosowano statystyczną analizę wielowymiarową (MVDA) w celu obserwacji wzajemnych podobieństw, a następnie stworzenia modeli klasyfikacyjnych i predykcyjnych. Termin „features” często tożsamy jest z pikami, bądź konkretnymi związkami, w tej pracy termin ten był tożsamy z peptydami po trawieniu.

W celu znalezienia charakterystycznych cech w 18 badanych próbkach (3 rodzaje mięsa ryb, surowe i gotowane, w 3 powtórzeniach) zastosowano algorytm wchodzący w skład oprogramowania Mass Hunter Data Qualitative Software. Obiektem zainteresowań były peptydy obecne we wszystkich próbkach danej grupy. Autorka wykazała, że dla soli zarejestrowano 3733 cech, zimnicy – 3348, a dla pangii – 2530, przy czym różnicujących odpowiednio 2665, 2239 oraz 1679. Przy selekcji cech oprócz filtra częstotliwości (występowania) zastosowano także filtr minimalnej abundancji, co w wydatny sposób zmniejszyło liczbę cech do tych, o największej intensywności. Liczba cech po zastosowaniu obydwu filtrów wyniosła dla soli 1345, zimnicy – 860, a dla pangii – 673.

Utworzone wykresy analizy składowych głównych (PCA) wykazały, że w oparciu o profil peptydów można różnicować badane próbki (3 gatunki ryb, zarówno surowe, jak i gotowane), co więcej, dla soli i pangii skupiska próbek ryb surowych od gotowanych są od siebie oddalone. W oparciu o badane próbki wykorzystano analizę OPLS-DA do stworzenia modelu predykcyjnego, dla którego przeprowadzono walidację i określono zdolność predykcyjną w wariantach bez wstępnie przygotowanych danych i poddanych normalizacji SNV (*ang. standard normal variate*) – stosowanej najczęściej w analizie widm. Do testowania modelu OPLS-DA wykorzystano „nieznane” dwie próbki zimnicy, które nie były wykorzystywane w tworzeniu modelu.

Ponieważ, w odróżnieniu od morszczuka i mintaja sekwencje peptydów dla soli, pangii i zimnicy były nieznane, parametrami, które je charakteryzowały i nad którymi wyłącznie się skupiono, był czas retencji oraz dokładna wartość masy jonów. Przeprowadzono ręczną weryfikację tak stworzonych markerów peptydomicznych dla każdego z badanych 3 gatunków ryb (Tabela 15), tworząc bazę danych użytkownika (PCDL). Do sprawdzenia przydatności opracowanego podejścia w wykrywaniu zafałszowań soli wykorzystano mieszaninę 5% soli w zimnicy i 5% zimnicy w soli. Badane próbki przeszukiwano względem baz danych PCDL. Dla próbek zawierających 5% soli w zimnicy zidentyfikowano 11 spośród 80 markerów dla soli, dla próbek, które zawierały 5% zimnicy w soli zidentyfikowano 22 z 141 markerów. Wyniki te wskazują na potencjał wykorzystania proponowanego podejścia w

identyfikacji zafałszowań produktów rybnych mięsem innych gatunków ryb, aczkolwiek badania te niewątpliwie wymagają kontynuacji, jak zresztą zauważa autorka. Ostatnią część pracy stanowi rozdział Podsumowanie i Dyskusja, nie ma natomiast odrębnego rozdziału z wnioskami płynącymi z pracy.

Uwagi dotyczące części wynikowej:

- Str. 82, wiersz 4: autorka pisze, że intensywność całkowitego prądu jonowego dla mintaja była wyższa (o ok. 25%) niż dla morszczuka. Czym te różnice mogły być spowodowane?
- Str. 89 Ryc. 20: w opisie widnieje uwaga, że zidentyfikowane peptydy zaznaczono na czerwono, podczas gdy całość Ryc. 20 jest wydrukowana czarną czcionką (podobnie w wersji pdf pracy).
- Str. 134-147: Odnośnie analiz statystycznych z wykorzystaniem oprogramowania do analizy wielowymiarowej: Badania polegały na szukaniu różnic w profilu peptydów mięsa trzech gatunków ryb. Wstępne różnicowanie próbek autorka prowadziła z wykorzystaniem metody analizy składowych głównych (PCA). W opisanej sytuacji PCA (a także utworzony później model OPLS-DA) tworzone były dla bardzo małej liczby obserwacji (trzy rodzaje mięsa ryb w dwóch wariantach) i bardzo dużej liczby zmiennych („cech”) (kilkaset do kilkunastu tysięcy). Na potrzeby PCA oraz przede wszystkim weryfikacji poprawności modelu OPLS-DA zasadne byłoby zbadanie większej liczby próbek mięsa ryb należących do każdego z gatunków. W przedstawionych danych nie ma możliwości oceny zróżnicowania w obrębie gatunku, bo stanowią ją replikacje jednego obiektu. Zdaję sobie sprawę, że analiza dodatkowych np. 10, a najlepiej więcej próbek każdego typu mięsa wymagałaby znacznie więcej czasu, ale znacznie poprawiłoby jakość danych statystycznych. PCA należy do metod bez nadzoru/uczenia (unsupervised learning), w związku z tym traktowanie PCA jako modelu do klasyfikacji i predykcji nie powinno być stosowane (str. 141, wiersz 3 i następne). PCA jest natomiast często wykorzystywane do detekcji tzw. „outliers”, co przy analizowanej liczbie prób było niemożliwe. W opisie przygotowania danych do analizy PCA i OPLS-DA nie znalazłem szczegółów na temat ew. wstępnej obróbki danych. Dodatkowym problemem przy modelach zawierających bardzo mało obiektów i bardzo dużo zmiennych (loadings) jest przy tworzeniu modeli tendencja do tzw. overfittingu. Co na ten temat sądzi autorka?
Str. 137, wiersz 7: autorka pisze, interpretując wykres PCA, że „różnice pomiędzy surowymi i gotowanymi próbkami, a także różnice pomiędzy gatunkami ryb może się brać z różnic naważki użytej do trawienia, a także zawartości wody w surowych i gotowanych filetach”.
Skąd taki wniosek?
Na marginesie, dlaczego do PCA użyto 18419 peptydów wybranych w oparciu o oprogramowanie, bez filtrowania, gdzie występowały one w co najmniej 3 przypadkach, a nie użyto od razu wyłącznie zidentyfikowanych peptydów o których mowa w podrozdziale 7.1.2? Model OPLS-DA pozwolił na rozróżnienie mięsa badanych ryb w oparciu o zaproponowane markery (Ryc. 40 i Ryc. 41), natomiast w mojej opinii budowanie modelu służącego docelowo do predykcji na podstawie tak małej liczby próbek, nawet biorąc pod uwagę specyfikę prowadzonych badań, powinno być traktowane raczej jako wstępny „proof of concept” i

poparte rozbudową modelu o znacznie większą liczbę próbek mięsa ryb każdego gatunku, co umożliwiłoby także jego pełniejszą walidację.

- Strona 148, ostatni wiersz: powinno być Tabela 15 a nie 16

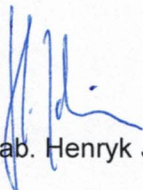
Powyższe uwagi mają charakter edytorski, techniczny i polemiczny i nie umniejszają dokonań autorki rozprawy.

W mojej opinii praca wnosi wiele ciekawych informacji w obszarze wykorzystania proteomiki do wykrywania zafałszowań mięsa danego gatunku ryb innymi gatunkami. Autorka wykazała, że chromatografia cieczowa w zestawieniu ze spektrometrią mas wysokiej rozdzielczości, a bardziej precyzyjnie spektrometrem umożliwiającym fragmentację CID wyposażonym w filtr kwadropolowy i analizator czasu przelotu wysokiej rozdzielczości jest bardzo dobrym narzędziem analitycznym do identyfikacji zafałszowań w oparciu o profile termostabilnych peptydów, charakterystycznych dla mięsa danego gatunku ryb. W badaniach swoich autorka wykorzystła podejście bottom-up z trawieniem próbek trypsyną na etapie przygotowanie próbek.

Głównymi osiągnięciami części pierwszej pracy jest opracowanie metody rozróżniania morszczuka od mintaja w oparciu o analizę proteomu. W rezultacie stworzono bazę danych użytkownika (PCDL) zawierającą 39 opornych termicznie specyficznych markerów peptydowych – 22 dla mintaja oraz 17 dla morszczuka. Pierwsza część wyników pracy jest bardzo dobrze przeprowadzona i udokumentowana. Skompletowanie wartościowych wyników wymagało bardzo dużo czasu, szczególnie jeśli chodzi o identyfikację peptydów z wykorzystaniem MS/MS oraz przeszukiwanie baz danych. Przydatność zidentyfikowanych markerów peptydowych do wykrywania pochodzenia gatunkowego ryb przetestowano z sukcesem na próbkach paluszków rybnych.

W drugiej części pracy w odniesieniu do badanych próbek mięsa trzech gatunków ryb zastosowano trochę inne podejście - nie podjęto się identyfikacji sekwencji poszczególnych peptydów, natomiast poprzestano na wyselekcjonowaniu markerów proteomicznych (cech/pików) scharakteryzowanych przez masę cząsteczkową najbardziej intensywnego jonu, jego ładunek, czas retencji i intensywność. O ile dokładny pomiar masy takich markerów jest wartością powtarzalną i stałą, to czas retencji oraz intensywność będą zależne (nawet przy zachowaniu tych samych warunków chromatografii) od stanu fazy stacjonarnej, czystości spektrometru, ew. supresji jonów w procesie jonizacji i innych czynników, o czym należy pamiętać. Zdaję sobie sprawę, że przeprowadzenie identyfikacji peptydów analogicznie jak to zrobiono w części pierwszej wymagałoby znacznego wydłużenia czasu badań, aczkolwiek podniosłoby jakość wyników zamieszczonych w drugiej części pracy. Pozytywnym wynikiem badań drugiej części jest możliwość wykorzystania wyselekcjonowanych cech do tworzenia baz danych użytkownika (PCDL), które mogą być wykorzystane do szybkiej identyfikacji zafałszowań.

Podsumowując, praca stanowi interesujące przedstawienie możliwości, jakie daje proteomika w wykrywaniu zafałszowań mięsa ryb. Wnosi cenne informacje do zagadnienia zafałszowań żywności, istotnych z punktu widzenia konsumenta i rynku. Spełnia one wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim. Na duże uznanie zasługuje biegłość autorki w posługiwaniu się zarówno technikami łączonymi, jak i zaawansowaną obróbką danych. Biorąc powyższe pod uwagę zwracam się do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego o dopuszczenie pani mgr Anny Łuciuk do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki chemiczne.



Prof. dr hab. Henryk Jeleń