

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Alicji Zachary pt. „Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne jako rzeczywiste zagrożenie występujące w środkach spożywczych” napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Lesława Juszcaka – promotora rozprawy oraz dr inż. Doroty Gałkowskiej – promotora pomocniczego w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kollątaja w Krakowie.

Ocena formalna rozprawy

Na rozprawę doktorską mgr inż. Alicji Zachary pt. „Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne jako rzeczywiste zagrożenie występujące w środkach spożywczych” składa się zbiór 5 spójnych tematycznie, reprezentujących komplementarne podejście do tematu, opublikowanych artykułów wraz z obszernym komentarzem oraz przeprowadzona w oparciu o wyniki badań ilościowych, opublikowanych w tych artykułach, ocena ryzyka związanego z pobraniem w diecie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych pochodzących ze środków spożywczych. Publikacje ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku wpływu z dziedziny technologii żywności i żywienia, zdrowia publicznego oraz nauk o środowisku: *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* – 2 artykuły w latach 2016 i 2017; *Food Analytical Methods* – 2017 r.; *Food Control* – 2017 r.; *International Journal of Environmental Research and Public Health* – 2018 r. W związku z koncepcją pracy doktorskiej przyjęto następującą ich kolejność:

1. Zachara A., Juszcak L. (2016). Zanieczyszczenie żywności wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi wymagania prawne i monitoring. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3(106), 5-20 (MNiSzW = 13 pkt)
2. Zachara A., Gałkowska D., Juszcak L. (2017). Method validation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by HPLC-FLD. *Food Analytical Methods*, 10, 1078-1086 (IF_{5-letni} = 1,982; MNiSzW = 30 pkt)
3. Zachara A., Gałkowska D., Juszcak L. (2017). Contamination of smoked meat and fish products from Polish markets with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food Control*, 80, 45-51 (IF_{5-letni} = 3,584; MNiSzW = 40 pkt)
4. Zachara A., Gałkowska D., Juszcak L. (2018). Contamination of tea and tea infusion with polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15, 45 (IF_{5-letni} = 2,540; MNiSzW = 30 pkt)
5. Zachara A., Gałkowska D., Juszcak L. (2017). Występowanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wybranych produktach zbożowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2(111), 67-77 (MNiSzW = 13 pkt)

Spójny tematycznie zbiór artykułów będący podstawą do ubiegania się o uzyskanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia zawiera 5 publikacji o łącznym 5-letnim współczynniku IF = 8,106 oraz łącznej liczbie punktów MNiSzW = 126 pkt. Są to bardzo przyzwoite wskaźniki, przewyższające te spotykane w niektórych postępowaniach o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich pięciu publikacjach co jednoznacznie wskazuje na to, że była osobą odpowiedzialną za sformułowanie hipotezy badawczej, zaplanowanie prac eksperymentalnych, przeprowadzenie analiz, opracowanie i interpretację wyników oraz przygotowanie publikacji. Udział doktorantki w realizacji prac badawczych opisanych w publikacjach wyniósł od 70 do 90%. Załączone oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości co do kluczowej roli Doktorantki w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna rozprawy

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) stanowią jedną z podstawowych grup zanieczyszczeń chemicznych, bardzo powszechnie występujących w środowisku. Mogą one zanieczyszczać żywność poprzez depozycję środowiskową, ale również w wyniku obróbki termicznej. Przyjmuje się, że zanieczyszczenie produktów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego WWA jest przede wszystkim konsekwencją stosowanych zabiegów przetwórczych oraz sposobów przygotowania tej żywności do spożycia. Do procesów, które w istotny sposób przyczyniają się do zwiększenia zanieczyszczenia policyklicznymi węglowodarami zalicza się głównie wędzenie, pieczenie na rożnie oraz grillowanie, prażenie, a także suszenie, zwłaszcza konwekcyjne. Oleje roślinne mogą być zanieczyszczone WWA w wyniku procesów przetwarzania roślin oleistych, głównie w trakcie suszenia surowców, a także poprzez zastosowanie zanieczyszczonych rozpuszczalników ekstrakcyjnych. W przypadku herbat powszechnie sądzi się, że ich zanieczyszczenie poliarenamami może być konsekwencją zarówno środowiskowego skażenia materiału roślinnego, jak i procesu suszenia surowca. Zanieczyszczenie środowiska wodnego jest przyczyną występowania często znacznych ilości WWA w rybach, a zwłaszcza małżach. Poziom zanieczyszczenia preparatów do żywienia niemowląt, a więc mleka początkowego i następnego w proszku przez WWA może być uzależnione zarówno od stopnia skażenia środowiska (obszaru, z którego pozyskiwany jest surowiec), jak również od zastosowanych warunków suszenia. W przypadku żywności dla małych dzieci, powstałej zgodnie z deklaracją producenta ze świeżych surowców najwyższej jakości, gotowanych na parze, pasteryzowanych zanieczyszczenie WWA może być również konsekwencją środowiskowego zanieczyszczenia surowców, zwłaszcza warzyw oraz poziomu zanieczyszczenia wody pitnej użytej do sporządzenia tej żywności. Zanieczyszczenie chleba WWA może zależeć od zarówno poziomu zanieczyszczenia surowców, głównie mąki, jak również samego procesu pieczenia. Ważnym czynnikiem jest temperatura pieczenia i jej wpływ na poziom zanieczyszczenia chleba przez WWA.

Badania nad oceną ryzyka związanego z pobraniem w diecie wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych pochodzących z wymienionych powyżej środków spożywczych wymagają interdyscyplinarnego warsztatu badawczego i skoordynowanego działania specjalistów. W ten nurt wpisują się badania prowadzone przez Katedrę Analizy i

Oceny Jakości Żywności Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, jak również macierzystą jednostkę zatrudniającą Doktorantkę, tj. Laboratorium Higieny Żywności i Żywienia Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Rzeszowie.

W komentarzu do cyklu publikacji podsumowane zostały: cel pracy, hipotezy badawcze i cele szczegółowe, które miały posłużyć do weryfikacji hipotez badawczych. Podjęta w rozprawie problematyka jest z pewnością zgodna ze współczesnymi trendami w szeroko pojętej analizie żywności, jak również w ocenie wpływu skażenia żywności związkami chemicznymi na zdrowie konsumentów. Dostępne piśmiennictwo i oficjalne raporty pokazują, że temat jest niezwykle istotny z punktu widzenia zdrowia publicznego. Prace nad oznaczaniem zawartości WWA w produktach spożywczych były i są podejmowane przez wiele grup na całym świecie. Intensywne badania w tym temacie były prowadzone w ostatnich latach w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w grupie prof. Mieczysława Obiedzińskiego oraz w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie przez dr hab. inż. Artura Ciemniaka (zresztą Doktorantka w swojej rozprawie cytuje szereg prac tych autorów). **W tym miejscu chciałbym prosić Doktorantkę o przedstawienie niewątpliwych elementów nowości swojej rozprawy i odpowiedzenie na pytanie na czym polegała przewaga badań, które złożyły się na rozprawę nad prowadzonymi przez inne zespoły badawcze.**

Czytając szczegółowo cel pracy i hipotezy badawcze nasunęły mi się jeszcze dwa komentarze/pytania. **1. Czy sformułowanie o „środkach spożywczych dostępnych w wybranych rejonach południowej Polski” jest wystarczająco precyzyjne? Czy dostarcza czytelnikowi odpowiedniej ilości informacji o materiale poddawanych analizom? Czy na zawartość WWA wpływ ma sposób dystrybucji produktów spożywczych, sieć sprzedaży, czy raczej pochodzenie surowca, proces wytwarzania, przechowywania itd.? 2. Czy zdaniem Doktorantki nie lepiej byłoby uznać samo oszacowanie wielkości narażenia konsumentów na WWA pobierane wraz z żywnością oraz próbę oceny rzeczywistego ryzyka zagrożenia jakie niesie ze sobą obecność WWA w środkach spożywczych za główny cel szczegółowy, przyjmując, że walidacja metod oznaczania i analiza zawartości 4WWA w różnych grupach środków spożywczych była jedynie narzędziem/środkiem do osiągnięcia zasadniczego celu?**

Zakres zaplanowanych prac badawczych był niezwykle szeroki, złożony, wieloaspektowy i pracochłonny. Wymagał znacznych nakładów środków, sił i indywidualnego zaangażowania Doktorantki. Ambitnie zaplanowana, usystematyzowana praca badawcza przebiegała w logicznym ciągu, co świadczy o dojrzałym ujęciu zagadnienia. W pierwszej pracy o charakterze eksperymentalnym (publikacja nr 2) Doktorantka podjęła próbę oznaczenia zawartości benzo(a)pirenu, benz(a)antracenu, benzo(b)fluoroantenu oraz chryzenu, jak również sumę 4WWA w olejach rzepakowych rafinowanych oraz w olejach rzepakowych z pierwszego tłoczenia. Na podstawie badań stwierdzono, że zawartość benzo(a)pirenu oraz sumy 4WWA we wszystkich przebadanych próbkach olejów nie przekroczyła najwyższych dopuszczalnych poziomów zawartych w Rozporządzeniu Komisji (UE) Nr 2015/1125. Oleje nierafinowane charakteryzowały się statystycznie istotnie wyższym poziomem zanieczyszczenia przez WWA w porównaniu z olejem rafinowanym, co jest zgodne ze spostrzeżeniem wielu badaczy, którzy wykazali, że proces rafinacji odgrywa kluczową rolę w przetwórstwie roślin oleistych, ponieważ znacząco redukuje zawartość WWA w otrzymanym oleju. W publikacji nr 2 nie

stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zawartości 4WWA w rafinowanych olejach rzepakowych oraz rafinowanych olejach rzepakowych z pierwszego tłoczenia w porównaniu do rafinowanych olejów rzepakowych z pierwszego tłoczenia filtrowanych na zimno. **W jaki sposób można wytłumaczyć brak tych różnic, skoro w literaturze fachowej jednoznacznie wskazuje się na ogromne znaczenie filtracji w procesie oczyszczania olejów roślinnych. Wyjaśnienia wymaga także znacząco niższa zawartość benzo(a)pirenu oraz sumy 4WWA w porównaniu z innymi opublikowanymi pracami, w oliwie z wytłoczonych oliwek.**

W publikacji nr 3 Doktorantka opisała wyniki badań nad oznaczaniem poziomu zanieczyszczenia wyrobów tradycyjnie wędzonych, wyrobów wędzonych metodami przemysłowymi oraz z dodatkiem dymu wędzarniczego przez WWA. Doktorantka zastosowała metodę, o której napisała, że jest stosunkowo tania, ale jej istotnym ograniczeniem jest pracochłonność, czasochłonność, duże zużycie rozpuszczalników. Najtrudniejsze wydaje się oczywiście przygotowanie próbki do analizy. **Czy mogłaby Pani dokonać porównania metod oznaczania WWA dla celów strictly naukowych, z tymi, które można by zastosować w zakładach produkcyjnych dla celów rutynowych analiz i dla celów kontrolnych.** Wykazano, że wyroby tradycyjnie wędzone charakteryzowały się statystycznie istotnie wyższym poziomem zanieczyszczenia przez WWA w porównaniu z wyrobami wędzonymi metodami przemysłowymi oraz z dodatkiem dymu wędzarniczego. Konserwy rybne zawierały różne poziomy sumy 4WWA. **Dlaczego w konserwie ze szprota wędzonego w oleju suma 4WWA wyniosła 73,01 µg/kg, a dla konserw z innych ryb wędzonych maksymalnie 5,12 µg/kg. Jak podaje Doktorantka zawartość sumy 4WWA była najwyższa w kielbasie i szynce wieprzowej tradycyjnie wędzonej, a jednocześnie zawartość ta była znacząco wyższa niż opisana w publikacjach innych autorów. Dlaczego? Czy wiemy coś więcej o warunkach tradycyjnego wędzenia zastosowanego w tym przypadku?**

W publikacji nr 4 Doktorantka podjęła się trudnego z metodologicznego punktu widzenia zadania oznaczania WWA w herbatach oraz ich naparach. Trudność tego zadania wynika głównie z obecności substancji przeszkadzających oznaczeniu, takich jak kofeina, polifenole, cukry, kwasy organiczne, barwniki roślinne. **Czy właśnie to był powód zastosowania techniki QuEChERS w miejsce klasycznej i użytej w pozostałych badaniach ekstrakcji ciecz-ciecz w kolumnie chromatograficznej wypełnionej tlenkiem glinu? Proszę wykazać wyższość techniki QuEChERS nad klasycznymi technikami ekstrakcyjnymi.** W kontekście przedstawionych w publikacji wyników oznaczeń ilościowych pojawiają się następujące pytania: a) dlaczego zawartość benzo(a)pirenu oraz sumy 4WWA w herbatach dostępnych w Polsce była znacząco wyższa niż w herbatach dostępnych w Czechach, Dani, Niemczech i Argentynie?, b) dlaczego transfer 4WWA z herbaty do naparu był zbliżony dla herbat czerwonej, białej i zielonej, a dla herbaty czarnej znacząco niższy?

W publikacji nr 5 przedstawiono wyniki badań, których celem było określenie poziomu zanieczyszczenia różnych rodzajów produktów zbożowych benzo(a)pirenem oraz sumą 4WWA. Materiał badany stanowiły dostępne handlowo płatki zbożowe, kasze, chleby, pieczywo chrupkie, musli, a także produkty dla niemowląt i dzieci, takie jak kaszki zbożowe i mleczno-zbożowe. We wszystkich badanych próbkach produktów zbożowych zawartość benzo(a)pirenu oraz sumy 4WWA nie przekroczyła 1 µg/kg, tj. ilości stanowiącej najwyższy dopuszczalny poziom w produktach przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci, zgodnie z

wymaganiami Rozporządzenia Komisji (UE) Nr 2015/1125. W żadnej z badanych kaszek nie wykryto benzo(a)pirenu.

Bardzo wartościowym uzupełnieniem cyklu publikacji jest przeprowadzona przez Doktorantkę ocena ryzyka związanego z pobraniem w diecie WWA pochodzących ze środków spożywczych. **Przy oszacowaniu dziennego spożycia wybranych produktów spożywczych posłużono się stosunkowo starymi, bo z 2000 r., danymi dotyczącymi spożycia żywności przez osoby w wieku od 1 do 96 lat. Wydaje się, że w ciągu 20 lat preferencje żywieniowe osób w różnym wieku zmieniły się dosyć istotnie. Proszę Doktorantkę o komentarz. W podrozdziale dotyczącym oszacowania narażenia niemowląt na WWA pochodzące z kaszek zbożowych raczej niepotrzebnie zamieszczono Tabelę 6. W przypadku spożycia dwóch posiłków zawierających łącznie 90 g suchego produktu, przy zachowaniu tej samej masy ciała dzieci, narażenie na benzo(a)piren i sumę 4WWA będzie po prostu dwa razy większe niż w przypadku spożycia jednego posiłku (Tabela 5).** W przypadku przeciętnego poziomu narażenia wybranych grup konsumentów nie stwierdzono istotnego zagrożenia dla zdrowia w wyniku spożycia produktów spożywczych ze wszystkich analizowanych grup – otrzymano wartości marginesu narażenia powyżej 25000. W przypadku wysokiego poziomu narażenia wybranych grup konsumentów zidentyfikowano wysokie ryzyko dla zdrowia konsumentów dorosłych oraz dzieci w przypadku spożycia kiełbas wędzonych. W sytuacji przeciętnego i dużego spożycia przetworów zbożowych przez dzieci w wieku 4-9 lat (biorąc pod uwagę tzw. scenariusz najgorszego przypadku) zaobserwowano podwyższone ryzyko dla zdrowia dzieci związane z pobraniem benzo(a)pirenu.

Przeprowadzona ocena ryzyka związanego z pobraniem w diecie WWA stanowi trudne do przecenienia uzupełnienie pięciu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, gdyż jak zauważyła sama Doktorantka „w literaturze przedmiotu znaleźć można bardzo niewiele publikacji dotyczących oszacowania narażenia konsumentów na WWA pochodzące z produktów spożywczych znajdujących się w obrocie handlowym w Polsce”.

Doktorantka w komentarzu przedstawiła 9 wniosków, które nawiązują do celu badań i mają charakter uogólniający. Są sformułowane poprawnie, chociaż niektóre stanowią zbyt dosłowne powtórzenie wyników. Wnioskowanie oparte jest na szerokim materiale dowodowym poddanym analizie statystycznej. Najcenniejszym i najbardziej istotnym z technologicznego i praktycznego punktu widzenia wydaje się być wniosek ostatni.

Podsumowanie

Podsumowując należy stwierdzić, że Doktorantka przedstawiła kompletną analizę zagadnienia potencjalnego zagrożenia dla zdrowia konsumentów ze strony wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych występujących w środkach spożywczych dostępnych w wybranych rejonach południowej Polski. Praca wnosi wiedzę podstawową głównie w zakresie walidacji i szacowania niepewności zastosowanych metod badawczych, praktyczną w zakresie doboru i zastosowania najbardziej optymalnych metod przygotowania próbek do analizy i ilościowego oznaczania WWA metodą chromatografii cieczowej HPLC z detekcją fluorescencyjną, a jednocześnie zgodnie z profilem Uczelni charakter aplikacyjny. Należy podkreślić znaczenie rozprawy doktorskiej dla producentów żywności, osób zawodowo związanych z bezpieczeństwem i higieną żywności i żywienia, a przede wszystkim konsumentów. Przedstawione w recenzji wątpliwości, prośby o wyjaśnienia, czy propozycje

uzupełnień w żaden sposób nie pomniejszają wartości naukowej rozprawy, a stanowią głównie wyraz dużego zainteresowania recenzenta omawianą tematyką.

Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr inż. Alicji Zachary z pełnym przekonaniem stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późn. zmianami (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Spełnione zostały wymagania merytoryczne: trafność podjętego tematu, trafność celu rozprawy, szczegółowa motywacja badań, właściwa praca twórcza, spełnienie wymogów nowatorstwa i co najważniejsze wyraźny aspekt aplikacyjny uzyskanych wyników. Całość pracy oceniam pozytywnie albowiem w moim przekonaniu spełnia ona ustawowy warunek oryginalnego rozwiązania problemu naukowego oraz wskazuje na bardzo dobry poziom ogólnej wiedzy Doktorantki w zakresie reprezentowanej dyscypliny naukowej.

Wniosek końcowy

Na podstawie szczegółowej analizy rozprawy i przedstawionej recenzji stawiam wniosek do Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie mgr inż. Alicji Zachary do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

