

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Piotra Pokrzywy pt.: „**Wpływ wybranych czynników na zawartość trichotecenów z grupy A i B w produktach zbożowych, w tym przeznaczonych dla dzieci**” wykonanej w Katedrze Technologii Produktów Roślinnych i Higieny Żywności na Wydziale Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie. Promotorem rozprawy doktorskiej jest dr hab. Magdalena Surma, prof. URK.

Podstawa prawna oceny:

Pismo DTŻ 520-38-151/2022 Przewodniczącego rady dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie, Pana dr. hab. inż. Marcina Łukasiewicza z dnia 20.07.2022 r. informujące o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Piotra Pokrzywy.

Recenzję przygotowano zgodnie z obowiązującymi regulacjami prawnymi w tym zakresie:

Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003r. (Dz.U. z 2017r poz. 1789 ze zm.) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dn. 26 września 2016r w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 30 września 2016r poz. 1586).

Podstawowe dane o kandydacie

Pan mgr inż. Piotr Pokrzywa ukończył w 2000 r. Wydział Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Krakowie uzyskując tytuł mgr. inż. technologii żywności. Podjął pracę w 2001 r. w Oddziale Nadzoru Higieny Żywności, Żywnienia i Procesów Nauczania w Wojewódzkiej Stacji Sanitarно-Epidemiologicznej (WSSE) w Krakowie jako młodszy asystent, asystent, a następnie objął obowiązki kierownika Sekcji Higieny Żywnienia w Wojewódzkiej Stacji Sanitarно-Epidemiologicznej. Obecnie Kandydat jest kierownikiem Oddziału Nadzoru Higieny Żywności i Żywnienia w WSSE.

W 2004 r. ukończył studia podyplomowe Zarządzanie Jakością w Przemysle Spożywczym. W 2013r. odbył szkolenie specjalizacyjne w ochronie zdrowia i uzyskał kwalifikację specjalista w dziedzinie epidemiologii. W pracy zajmuje się zagadnieniami związanymi z bezpieczeństwem żywności i

żywienia. Doktorant jest współautorem ośmiu prac naukowych: polskich, jak również zagranicznych, które zostały opublikowane w czasopismach naukowych posiadających IF.

Ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Piotra Pokrzywy zatytułowana „*Wpływ wybranych czynników na zawartość trichotecenów z grupy A i B w produktach zbożowych, w tym przeznaczonych dla dzieci*” stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Została ona przedstawiona w postaci opracowania **trzech prac badawczych**, które opublikowano w latach 2019, 2021 i 2022r o łącznym IF 3,876. Są to prace:

1. Pokrzywa P., Surma M., Cieślik E., *Effect of storage conditions on the formation of type A and B trichothecenes in cereal products. Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2019, Vol. 26, No 2, 260-265;
2. Pokrzywa P., Cieślik E., Surma M. *Effect of cereal products supplementation with american blueberries, cranberries and cinnamon on the formation of type A and B trichothecenes group. Ann Agric Environ Med.* 2021; 28(1): 72–80;
3. Pokrzywa P., Surma M. *Level of contamination with deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in cereal products – assessment of consumer exposure. Ann Agric Environ* 2022, DOI:10.26444/aaem/144416.

Pan mgr inż. Piotr Pokrzywa we wszystkich trzech publikacjach jest pierwszym autorem. W załączniku 2 umieścił Doktorant oświadczenia, w których wykazał swój udział w powstawaniu publikacji wynoszący odpowiednio 60%, 55% i 80%.

Dysertacja doktorska przedstawiona do recenzji liczy 57 stron maszynopisu, na których umieszczono sześć rozdziałów, w tym w obrębie rozdziału 3 i 4 zamieszczono podrozdziały. Zasadniczy tekst pracy doktorskiej poprzedza streszczenie w języku polskim i języku angielskim, indeks skrótów i wykaz publikacji. Na końcu dysertacji doktorskiej umieszczono literaturę oraz dwa załączniki; jeden będący zbiorem publikacji i drugi stanowiący oświadczenia współautorów.

Struktura pracy doktorskiej jest komplementarna z treścią i stanowi logicznie połączenie zagadnień teoretycznych z metodologią oraz wykonywanymi analizami. Należy podkreślić bardzo szeroki zakres zaplanowanych i zrealizowanych badań naukowych, które zostały opublikowane w formie prac naukowych w czasopismach z IF.

Co prawda **bibliografia** przedstawionego do recenzji manuskryptu obejmuje jedynie 28 pozycji, ale w zbiorze trzech publikacji zawarte jest bogate i pod względem merytorycznym **poprawnie dobrane piśmiennictwo**, które stanowi przegląd aktualnego stanu badań. Sposób cytacji prac w manuskrypcie jest prawidłowy. Część norm, do których odwołuje się Autor zostało wycofanych w roku 2020 i

zastąpione normami europejskimi. Normy te dotyczą oznaczania liczby drożdży i pleśni w produktach żywnościowych. Jednak ich wykorzystanie do badań analitycznych nie jest błędne, prezentują one mniej nowoczesne rozwiązania.

Układ manuskryptu jest logiczny i spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim. Praca w zdecydowanej większości napisana została językiem zrozumiałym i poprawnym stylistycznie, umożliwiającym śledzenie i analizę przedstawionych w publikacjach wyników poprzez zamieszczenie właściwych odsyłaczy, podsumowania i wniosków. Dopelnieniem pracy byłoby zamieszczenie w niej rozdziału zatytułowanego *Dyskusja*. W zbiorze publikacji przedstawiono rozdziały *Materiał i Metody*, jak również *Wyniki i Dyskusja*, natomiast w dysertacji umieszczono wyłącznie rozdziały *Materiał i metody* oraz *Omówienie wyników*.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

W rozprawie doktorskiej Autor przedstawił następujące cele:

1. *Ocena stopnia zanieczyszczenia zbóż oraz produktów zbożowych trichotecenami z grupy A i B;*
2. *Ocena potencjalnego zagrożenia dla konsumentów wynikającego ze spożycia produktów zbożowych w szczególności produktów przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci;*
3. *Ocena wpływu warunków przechowywania zbóż oraz produktów zbożowych na powstawanie mykotoksyn;*
4. *Ocena wpływu wzbogacania produktów zbożowych związkami o charakterze przeciwtleniającym (liofilizaty z borówki amerykańskiej i żurawiny oraz cynamon) na powstawanie mykotoksyn.*

Doktorant przedstawił również hipotezy badawcze:

- 1) *temperatura oraz czas przechowywania żywności nieprzetworzonej (zbóż), oraz produktów zbożowych ma wpływ na poziom mykotoksyn z grupy trichotecenów A i B,*
- 2) *dodatek naturalnych źródeł substancji bioaktywnych, w tym przeciwutleniaczy (liofilizat borówki amerykańskiej, żurawiny oraz suszony cynamon) hamuje proces powstawania mykotoksyn.*
- 3) *spożycie produktów zbożowych oraz produktów zbożowych przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci zanieczyszczonych deoksyniwalenolem, zearalenonem i fumonizyną stanowi zagrożenie dla zdrowia,*

Cel pierwszy został zrealizowany i przedstawiony w publikacji pierwszej, a także w trzeciej, wskazując na zanieczyszczenia zbóż oraz produktów zbożowych trichotecenami z grupy A i B. Doktorant podkreślił brak badanych toksyn w produktach zbożowych przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci.

Cel drugi został zrealizowany w formie obliczeń szacunkowych określających narażenie konsumentów na działanie mykotoksyn. W pracy doktorskiej przedstawiono również realizację celu trzeciego, stwierdzając istotny statystycznie wpływ temperatury i czasu na powstawanie mykotoksyn. Opiszano również bardzo dokładnie realizację celu czwartego. Zaplanowano i przeprowadzono panel badań związanych z potencjałem antyoksydacyjnym produktów zbożowych po dodaniu w różnych stężeniach liofilizatów borówki amerykańskiej (*Vaccinium corymbosum* L.), żurawiny (*Vaccinium macrocarpon*) oraz proszku cynamonu cejlońskiego (*Cinnamomum verum*).

W pracy doktorskiej, Doktorant nie odniósł się do wszystkich postawionych hipotez badawczych, nie wskazał, które hipotezy zostały odrzucone, a które przyjęte. Bardzo trudno jest zweryfikować hipotezę trzecią, jeżeli stosowany jest tylko szacunkowy sposób oceny zagrożenia.

W załączonych do rozprawy doktorskiej publikacjach Doktorant bardzo szczegółowo przedstawił wyniki swoich badań.

W pierwszej pracy Pokrzywa i in. 2019 opisano rodzaj materiału badawczego, jaki został poddany ocenie poziomu czystości mikrobiologicznej (ogólna liczba pleśni) oraz ocenę stopnia zanieczyszczenia mykotoksynami z grupy trichotecenów A i B. Wykorzystano próby badawcze ziaren zbóż pszenicy i owsa (po 8 prób), otrąb pszennych i owsianych (po 8 prób) oraz produktów zbożowych dla niemowląt i małych dzieci (8 prób). Zbadano liczbę pleśni, najniższy poziom zanieczyszczenia stwierdzono w próbkach produktów zbożowych dla dzieci a najwyższy poziom był w ziarnie zbóż, przy czym wyższy poziom oznaczono w ziarnie owsa niż pszenicy. Liczba pleśni w otrębach pszennych oraz owsianych była niższa niż w zbożach. Następnie dokonano oceny wpływu warunków przechowywania zbóż oraz produktów zbożowych na powstawanie mykotoksyn w zależności od temperatury (6°C i 25°C) i czasu (14 dni i 28 dni), przy zwiększonej wilgotności. Stwierdzono obecność trichotecenów z grupy A tj. toksyny HT-2 i diacetoksyscirpenolu (DAS) w testowanych produktach zbożowych oraz w ziarnach pszenicy. Przed rozpoczęciem badania nie stwierdzono obecności trichotecenów w badanych produktach zbożowych przeznaczonych dla dzieci, natomiast po 14 dniach przechowywania próbek w temperaturze 6°C nastąpił statystycznie istotny wzrost ilości toksyny HT-2.

W zakresie wpływu warunków przechowywania zbóż i produktów zbożowych na powstawanie mykotoksyn oszacowano zagrożenie dla konsumentów wynikające ze spożycia produktów zbożowych w odniesieniu do wartości tolerowanego dziennego spożycia (TDI) wykazując, że 14 dniowy czas ekspozycji na zwiększoną do 19% wilgotność i temperaturę jest czynnikiem sprzyjającym powstaniu toksyny HT-2 w ilościach stanowiących zagrożenia dla konsumenta. Dotyczyło to otrąb pszennych i owsianych oraz produktów zbożowych dla dzieci, w których wielokrotnie przekroczono wartość wskaźnika TDI.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy poziomami toksyny HT-2 w zależności od temperatury podczas przechowywania produktów zbożowych dla dzieci.

Temperatura 6°C bardziej sprzyjała powstawaniu toksyny HT-2 niż temperatura 28°C. Natomiast w próbkach zbóż i otrąb nie stwierdzono istotnego wpływu temperatury na poziom toksyny HT-2.

W drugiej pracy Pokrzywa i in. 2021 Doktorant opisał możliwości zastosowania liofilizatów borówki amerykańskiej (*Vaccinium corymbosum* L.), żurawiny (*Vaccinium macrocarpon*) oraz proszku cynamonu cejlońskiego (*Cinnamomum verum*) będących źródłem substancji bioaktywnych, które jako suplementy żywności będą hamować proces powstawania mikotoksyn w produktach zbożowych. Wykazał, że zmielone próbki zbóż, otrąb pszennych i owsianych wzbogacone odpowiednio liofilizatem z borówki amerykańskiej, żurawiny czy proszkiem cynamonowym w pięciu różnych stężeniach (3%, 5%, 10%, 20%, 30%) charakteryzowały się wzrostem potencjału antyoksydacyjnego. Do oceny aktywności przeciwutleniającej wykorzystano metodę wygaszania wolnego rodnika jakim jest sól diamonowa 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) - ABTS^{•+}.

W przypadku suplementowania produktów zbożowych przeznaczonych dla dzieci liofilizatami w stężeniu 20% i 30% Autor wskazał na statystycznie istotne zmniejszenie potencjału antyoksydacyjnego. Przeciwutleniacze występujące w surowcach roślinnych to: kwasy fenolowe, flawonoidy, flawony, polifenole, zatem dostarczane do organizmu człowieka wraz z żywnością pozwalają na zapobieganie negatywnym skutkom działania wolnych rodników. Cechą charakterystyczną dla antyoksydantów, a takimi są badane liofilizaty borówki i żurawiny, jest ich potencjał lub pojemność antyoksydacyjna. Pojemność antyoksydacyjna wyrażana jest najczęściej jako aktywność antyoksydacyjna. W pracy doktorskiej wnioskowanie odnośnie aktywności antyoksydacyjnej oparto na pomiarze jednego parametru. Biorąc pod uwagę, że badane liofilizaty stanowią źródło związków fenolowych warto rozważyć możliwość oceny ich pojemności antyoksydacyjnej metodą Folina-Ciocalteu. Doktorant wykazał, że próbki liofilizatów miały niższy potencjał antyoksydacyjny (wyrażony w $\mu\text{mol TE/g}$) niż badane produkty zbożowe przeznaczone dla dzieci, ale wyższy niż zboża i produkty zbożowe. Celowe byłoby wyjaśnienie przyczyny takich wyników.

W pracy Autor podaje, że po dodaniu suplementu do badanych próbek następuje proces zahamowania powstawania mykotoksyny HT-2, która jest głównym metabolitem toksyny T-2. Proces ten zależny był od rodzaju stosowanego dodatku i jego stężenia. Naturalne produkty zastosowane w doświadczeniu (liofilizaty borówki amerykańskiej, żurawiny) hamowały powstawanie toksyny HT-2, ale tylko w próbach zboża i produktach zbożowych. Niestety w pracy nie zostało zaproponowane wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania badanych suplementów (ich składników) na zmniejszenie ilości toksyny HT-2. Byłoby to wartościowym elementem pracy.

Liofilizaty borówki amerykańskiej i żurawiny powodowały istotne statystycznie zwiększenie zawartości toksyny HT-2 w produktach zbożowych przeznaczonych dla dzieci i, jak wcześniej zostało to wskazane, znacząco zmniejszały potencjał antyoksydacyjny tych próbek. Celowe byłoby zatem

wyjaśnienie przyczyny takiego wyniku, zwłaszcza że proszek cynamonu miał istotne statystycznie odwrotne działanie, tj. zwiększał potencjał antyoksydacyjny i obniżał zawartość toksyny HT-2 w produktach zbożowych przeznaczonych dla dzieci. Dobrze byłoby rozważyć możliwość istnienia związku między procesem powstawania mykotoksyn a potencjałem antyoksydacyjnym.

Wprowadzanie naturalnych przeciwutleniaczy do żywności nie jest regulowany przez prawo i nie wymaga zgody na ich zastosowanie, dlatego też słusznie Autor podaje konieczność prowadzenia badania w kierunku oceny konsumenckiej. Doktorant zwrócił uwagę, iż wykorzystywane suplementy wpływają na właściwości smakowe i zapachowe produktów zbożowych. Z tego też powodu przed ostatecznym ich zastosowaniem należałoby sprawdzić akceptację konsumencką takich dodatków.

Ostatnia, **trzecia publikacja** Pokrzywa i in. 2022 dotyczy analizy obecności trichotecenów typu B, takich jak deoksynivalenolu (DON), zearalenonu (ZEA) oraz fumonizyn (FUM) (wyrażonych jako sumę fumonizyny B₁ i B₂). Doktorant rozszerzył panel badawczy w stosunku do poprzednich prac. Badaniami objął dodatkowo produkty zbożowe takie jak mąki, kasze, makarony, produkty i wyroby przemysłu piekarskiego, oraz przekąski typu snack. W publikacji przedstawił wyniki badań dla 2493 analiz (831 prób badawczych wykonanych w trzykrotnych powtórzeniach), co stanowi obszerny i bardzo bogaty materiał analityczny. Na podstawie wykonanych analiz Doktorant wykazał obecność DON, ZEA oraz FUM w produktach zbożowych dostępnych w obrocie handlowym województwa małopolskiego.

Zawartość DON oznaczył metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem DAD (HPLC-DAD), a zawartość ZEA oraz fumonizyn metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC-FLD). Najczęściej stwierdzanym przez Doktoranta trichotecenem był FUM, a następnie DON oraz ZEA. Najczęściej toksyny FUM występowały w próbkach mąki kukurydzianej, kaszki kukurydzianej, płatków śniadaniowych na bazie kukurydzy oraz przekąsek kukurydzianych. Toksynę DON oznaczono w mące kukurydzianej, makaronie, pieczywie i produktach piekarniczych oraz w mące pszennej. Toksyna ZEA najczęściej występowała w mące kukurydzianej. Nie stwierdzono jej obecności, tak jak w przypadku DON i FUM, w produktach zbożowych przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci.

Na podstawie otrzymanych wyników Doktorant przeprowadził oszacowanie zagrożenia dla konsumentów wynikające ze spożycia produktów zbożowych. Obliczenia wykonał dla produktów zbożowych, w których najczęściej stwierdzano badane toksyny. Poziomy wyższe niż dozwolone dla badanych produktów zbożowych zaobserwowano tylko w dwóch przypadkach. FUM były najczęściej stwierdzaną mikotoksyną *Fusarium*, a następnie DON oraz ZEA. Średnie dawki ekspozycji ocenianych mykotoksyn, wynikających ze spożycia produktów zbożowych w wybranych populacjach były na niskim poziomie.

Uwagi końcowe

Poza nielicznymi błędami stylistycznymi i interpunkcyjnymi, które nie umniejszają oceny pracy

Str. 8 – Autor podał łączną liczbę punktów MNiSW (obecnie MeiN) 270, a powinno być 240

Str. 10 – Błędnie został podany rok w cytowaniu Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1881/2006 (zamiast 2006 Doktorant podał 2016).

Str. 15 – sączek papierowy, czyli jaki?

proszę o przeanalizowanie następujących uwag:

1. Autor powinien odnieść się do postawionych celów szczegółowych i sformułowanych hipotez badawczych w przedstawionym do recenzji manuskrypcie.
2. Załączono ocenę liczby kolonii, jednakże Doktorant nie wskazuje na rodzaj zanieczyszczenia. Czy podjęto próbę identyfikacji grzybów pleśniowych co do rodzaju na podstawie cech makro- i mikroskopowych? Nie przedstawiono jak pobierano próby badawcze (publikacja 1 i 2), czy również do ich poboru zastosowano obowiązującą normę?
3. Weryfikacja hipotezy 3 przedstawionej w dysertacji, dotycząca „*spożycia produktów zbożowych oraz produktów zbożowych przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci zanieczyszczonych deoksyniwalenolem, zearalenonem i fumonizyną, stanowiącego zagrożenie dla zdrowia*” wymagałaby zgromadzenia informacji o czynnikach powodujących występowanie stosunkowo wysokich poziomów toksyn T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych oraz o skutkach przetwarzania paszy i żywności. Dostępne dane to wartości szacunkowe, związane z narażeniem człowieka na sumę toksyn T-2 i HT-2 w diecie. Wartości te znajdują się poniżej tolerowanego dziennego pobrania dla populacji wszystkich grup wiekowych. Panel ds. zanieczyszczeń w łańcuchu żywnościowym CONTAM określił grupowe tolerowane dzienne pobranie na poziomie 100 ng/kg masy ciała dla sumy toksyn T-2 i HT-2.
4. W publikacji 1 Autor wykazał, że na wzrost mykotoksyn wpływa korzystnie temperatura 6°C, natomiast proces badawczy w publikacji 2 oparto o inkubowanie badanych prób w temperaturze 28°C. Proszę o wyjaśnienie tej rozbieżności warunków termicznych.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Praca doktorska mgr. inż. Piotra Pokrzywy jest interesującą i wartościową rozprawą naukową dotyczącą oceny zawartości substancji toksycznych jakimi są trichoteceny, w produktach spożywczych. Wyniki badań mają znaczenie w kreowaniu rynku konsumenckiego do wdrażania wzbogaconych o suplementy produktów spożywczych. Praca została dobrze zaplanowana i zrealizowana dużym nakładem sił i umiejętności. Rezultaty pracy zostały właściwie zinterpretowane. W swoich badaniach Doktorant wykorzystał wiele różnych technik, począwszy od podstawowych technik mikrobiologicznych poprzez analizy biochemiczne do technik analizy chromatografii cieczowej, a przy

opracowaniu danych stosował analizy statystyczne, w tym jedno i dwukierunkową analizę wariancji oraz analizę korelacji. **Uznaję recenzowaną rozprawę doktorską za oryginalną i zrealizowaną na wysokim poziomie merytorycznym.**

Rozprawa doktorska mgr. inż. Piotra Pokrzywy pt.: „Wpływ wybranych czynników na zawartość trichotecenów z grupy A i B w produktach zbożowych, w tym przeznaczonych dla dzieci” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz. 1798) oraz ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018r. Poz. 1669). **Stawiam tym samym wniosek** do Rady Naukowej dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie **o dopuszczenie Pana mgr. inż. Piotra Pokrzywy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Dr hab. inż. Renata Francik