

dr hab. inż. Małgorzata Dżugan, prof UR

Katedra Chemii i Toksykologii Żywności

Wydział Biologiczno-Rolniczy

Uniwersytet Rzeszowski

e-mail: mdzugan@ur.edu.pl, tel. 178721619

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Alicji ZACHARA pt. *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne jako rzeczywiste zagrożenie występujące w środkach spożywczych*

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Alicji Zachara została wykonana w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie pod kierunkiem prof. dra hab. inż. Lesława Juszczaaka oraz promotora pomocniczego dr inż. Doroty Gałkowskiej. Oceniana rozprawa doktorska składa się z 72-stronnicowego opracowania oraz 5 prac oryginalnych (kopie w Załączniku 1), opublikowanych w języku angielskim (3) i polskim (2), o łącznym współczynniku oddziaływania IF 8,11 i punktacji wg obowiązującej listy MNiSW-130pkt. Udział Doktorantki w każdej publikacji wliczanej do cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej wyniósł min. 70% (wg oświadczeń dwóch współautorów-załącznik 2). Część zasadnicza rozprawy doktorskiej mgr inż. Alicji Zachara, zawiera zwięzły opis przeprowadzonych badań (skrót publikacji) w układzie pracy naukowej tj. *Wprowadzenie* do podjętego problemu badawczego, *Cel i hipotezy badawcze*, syntetyczne omówienie *Materiału i metodyki badań oraz Omówienie i dyskusja wyników*. Oryginalnym elementem, "spinającym" publikacje są zamieszczone w *Rozdziale 7* pracy niepublikowane dotychczas wyliczenia dotyczące oszacowania ryzyka związanego z pobraniem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w diecie opartej na przebadanych środkach spożywczych. Na końcu załączono streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis literatury (124 poz.).

Merytoryczna ocena pracy doktorskiej

Tematyka badawcza podjęta w recenzowanej pracy jest skoncentrowana na ocenie ryzyka zdrowotnego związanego z występowaniem w żywności wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA, ang. PAHs), należących do grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych. Związki te, zaliczane do homocyklicznych poliarenów o hydrofobowych

właściwościach, powstają powszechnie w procesach pirolizy, w tym podczas palenia papierosów i termicznego utrwalania żywności, tj. tradycyjne wędzenie. Szczególne znaczenie w pobraniu WWA odgrywają dwie drogi: oddechowa oraz pokarmowa, a dane dotyczące absorpcji, dystrybucji i wydalania WWA pochodzą z badań eksperymentalnych na zwierzętach. Udowodniono, że niektóre WWA (lista UE-15 substancji) wykazują zróżnicowane działanie genotoksyczne, mutagenne i karcynogenne, związane ze specyficzną budową chemiczną (tzw. „bay region” w pochodnych fenantrenu). W celu ochrony zdrowia publicznego Komisja Europejska uregulowała obecność WWA w żywności. Regulacje UE zawierają szczegółowe wytyczne w zakresie najwyższych dopuszczalnych pozostałości WWA w produktach spożywczych (NDP), określają także wymagania i kryteria sprawności, stawiane metodom analitycznym stosowanym do analizy tych związków. Kontrola WWA w żywności jest zagadnieniem słabo rozpoznany (Bansal and Kim 2015, Domingo and Nadal 2015, Słowianek i Leszczyńska 2015), co potwierdza modyfikacja regulacji prawnych w ostatnich 10-ciu latach. Ponadto, ze względu na specyfikę analizy tych związków (sposób wyodrębnienia analitu z matrycy żywnościowej, analiza jakościowa i ilościowa-HPLC lub GC), porównanie wyników różnych autorów jest często utrudnione.

Przeprowadzona w 2008 roku ponowna ocena bezpieczeństwa diety Europejczyków pod kątem pobrania nadmiernych ilości WWA z diety wykazała, że ksenobiotyki te stanowią istotny problem zdrowia publicznego i wymagają podjęcia działań w kierunku ograniczenia ich pobrania. W 2011 roku ustalono najwyższy, dopuszczalny poziom pozostałości dla sumy czterech substancji (WWA 4) w żywności przy zachowaniu oddzielnego poziomu dla benzo(a)pirenu, a w kolejnych latach wprowadzono redukcję wskaźników dla przetworów wędzonych. W Polsce, ze względu na regionalne tradycje w zakresie wytwarzania i preferencje spożycia wyrobów mięsnych wędzonych na gorąco, ryzyko związane z nadmiernym pobraniem WWA w diecie może być istotnie wyższe niż w innych regionach UE. W tym kontekście podjęta w pracy tematyka stanowi niezwykle istotne zagadnienie, tak w aspekcie naukowym jak i dla ochrony zdrowia konsumentów.

Głównym celem badań podjętych w pracy doktorskiej było ustalenie czy WWA występujące w środkach spożywczych dostępnych na rynku południowo-wschodniej Polski stanowią rzeczywiste zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Do weryfikacji sformułowano trzy hipotezy badawcze i odpowiadające im cele szczegółowe:

1. Walidacja metod oznaczania 4 WWA (benzo(a)pirenu, benzo(a)antracenu, benzo(b)fluorantenu i chryzenu) w wybranych grupach środków spożywczych, wnoszących do diety znaczne ilości WWA.

2. Analiza poziomu ww. WWA w wybranych grupach środków spożywczych i ocena zgodności uzyskanych wyników z wymaganiami określonymi w regulacjach prawnych.
3. Oszacowanie wielkości narażenia konsumentów na WWA pobierane z żywnością oraz ocenę ryzyka rzeczywistego zagrożenia związanego z tym zanieczyszczeniem żywności.

Powyższe cele badawcze zostały osiągnięte w publikacjach stanowiących podstawę pracy doktorskiej, przy czym dwa pierwsze zostały zrealizowane w publikacjach 2-5, podczas gdy cel 3 został zrealizowany w Rozdziale 7 opracowania. Analizując treść artykułów, daje się zauważyć że prace były pisane w celu zrealizowania wcześniej założonego celu pracy. W pierwszej publikacji dokonano przeglądu zagadnień związanych z realizowanym tematem pracy doktorskiej, omówiono właściwości, występowanie WWA w środowisku, źródła narażenia i toksyczność oraz modyfikacje regulacji prawnych w latach 2005-2014. Analiza danych literaturowych dotyczących zawartości WWA w żywności, w zależności od stopnia jej przetworzenia, pozwoliła na wskazanie grup artykułów spożywczych będących istotnym źródłem WWA w diecie. W kolejnych publikacjach przedstawiono wyniki analiz zawartości WWA w wybranych grupach produktów spożywczych dostępnych na rynkach województwa podkarpackiego i małopolskiego (łącznie 230 próbek), tj. oleje roślinne (publikacja 2), wędzone przetwory mięsne i rybne (publikacja 3), herbaty i ich napary (publikacja 4) oraz wybranych produktach zbożowych (publikacja 5).

Do analizy zawartości WWA w każdej grupie środków spożywczych zastosowano technikę chromatografii cieczowej z detekcją fluorymetryczną (HPLC-FLD). Istotnym etapem analizy było przygotowanie próbki analitycznej do oznaczeń chromatograficznych, obejmujące etap zmydlania próbki, ekstrakcji frakcji węglowodorowej i oczyszczania na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu, tylko dla herbat zastosowano odmienne podejście (technika QuEChERS). W każdej publikacji, zamieszczono szczegółową ocenę poprawności stosowanej metody (m. in. LOD, LOQ, zakres liniowości i czułości, współczynnik odzysku) zgodnie z rozporządzeniem UE, co ułatwia wykorzystanie wyników w celach porównawczych.

W poszczególnych grupach środków spożywczych przebadano 30-60 próbek, dobranych pod kątem pochodzenia, tak aby można było uzyskać odpowiedź czy stwierdzony poziom WWA zależy od rodzaju surowca i/lub metody produkcji. Obserwowane różnice poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testu Tukey'a. Wykazano wyższy poziom analizowanych WWA w olejach nierafinowanych w porównaniu z olejami rafinowanymi, ale bez przekroczeń NDP. Stwierdzono istotnie wyższy poziom analizowanych związków w wyrobach wędzonych tradycyjnie w porównaniu do wędzonych przemysłowo, przy czym

przekroczenia dopuszczalnych poziomów stwierdzono dla takich produktów jak wędzona kiełbasa czy konserwa z wędzonego szprota w oleju. Poziom WWA w analizowanych herbatach był bardzo zróżnicowany, spełniał wymagane przepisami limity, a współczynnik przeniesienia zanieczyszczeń do naparów nie przekraczał 2%. Analizowane produkty zbożowe, zwłaszcza chleb i kaszki zbożowe dla dzieci zawierały niewielkie ilości analizowanych WWA i doskonale spełniały wymagania obowiązujących przepisów.

Metodyka i wyniki zawarte w tych publikacjach zostały już ocenione przez recenzentów wysoko punktowanych czasopism, w których się ukazały i merytorycznie nie budzą zastrzeżeń. Wkład Autorki w przygotowanie publikacji określony w oświadczeniach współautorów jako 90% (poz. 1), 75% (5), i 70% (2-4) wskazuje, że Doktorantka odegrała wiodącą rolę w zaplanowaniu i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.

W ostatnim rozdziale rozprawy Doktorantka podjęła próbę oszacowania ryzyka zdrowotnego, bazując na wynikach własnych dotyczących poziomu WWA w analizowanych produktach oraz przyjętych założeniach odnośnie ich dziennego spożycia, z wykorzystaniem właściwego narzędzia jakim jest margines narażenia (MoE). Wyznaczającienne pobranie poszczególnych produktów oparła się na danych zgromadzonych przez Instytut Żywności i Żywienia w 2000r., dostępnych w bazie danych EFSA, ale skonfrontowała je z nowszymi ustaleniami zawartymi w aktualnych publikacjach i bazie GUS. Pobranie jednolitego zestawu danych z bazy EFSA, umożliwiło oszacowanie dziennego pobrania WWA z żywnością przez konsumentów i dzieci, z uwzględnieniem różnych scenariuszy spożycia i zanieczyszczenia produktów spożywczych.

Niewątpliwe osiągnięcia badawcze pracy koncentrują się wokół zagadnień:

- Analiza zawartości WWA w środkach spożywczych dostępnych na rynku podkarpackim i małopolskim w aspekcie porównawczym do produktów dostępnych w innych regionach i najwyższych dopuszczalnych poziomów zawartych w regulacjach prawnych.
- Wykazanie bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów dorosłych przy założeniu przeciętnej diety opartej bez względu na poziom WWA w żywności ($MoE > 25000$).
- Wykazanie ryzyka narażenia konsumentów dorosłych na zwiększone pobranie WWA (wg scenariusza duże spożycie produktów wysoko zanieczyszczonych) w diecie z wysokim udziałem lokalnie dostępnych wędzonych wędlin, głównie kiełbas.
- Wykazanie bezpieczeństwa pobrania WWA przez dzieci w diecie złożonej z lokalnie dostępnych produktów oraz rosnące ryzyko związane z nadmiernym spożyciem kiełbas wędzonych przez dzieci.

- Wykazanie bezpiecznego pobrania WWA przez niemowlęta żywione kaszkami zbożowymi i mleczno-zbożowymi dostępnymi na lokalnym rynku (MoE>>25000).

Ocena formalna pracy

Forma rozprawy przyjęta przez Doktoranta – zbiór spójnych tematycznie publikacji naukowych – w znacznej części ogranicza rolę recenzenta jako oceniającego. Wynika to z faktu, iż załączone artykuły naukowe przeszły weryfikacje redakcyjne i wszelkie niedoskonałości oryginalnego tekstu zostały już usunięte. Z kolei komentarz do ich treści, przygotowany przez Doktorantkę, jest zwięzły, dobrze skonstruowany i napisany. Z obowiązku Recenzenta należy wymienić nieliczne błędy literaturowe i interpunkcyjne, np. benz(a)antracen, czy błędy w chronologicznym układzie bibliografii (poz. 47 i 49, 78-82), uwagi te nie mają znaczenia dla oceny merytorycznej rozprawy. Wnioskowanie końcowe wynika z przeprowadzonych badań i wskazuje, że założony do realizacji cel badawczy został osiągnięty w pełni. Z trudnego zadania, wymagającego interpretacji danych zawartych w 4 publikacjach, Doktorantka wywiązała się znakomicie. Bibliografia rozprawy doktorskiej zawiera 124 pozycje w układzie alfabetycznym, w tym 108 publikacji naukowych i 16 regulacji prawnych i baz danych (GUS, EFSA). Publikacje naukowe, polsko- i anglojęzyczne, zostały odpowiednio dobrane i w pełni wykorzystane w tekście opracowania, ponad 70% cytowanych publikacji pochodzi z ostatnich 10 lat.

Najistotniejszą częścią rozprawy podlegającą w całości recenzji jest rozdział 7, który stanowi podsumowanie wcześniejszych etapów pracy i pozwala na osiągnięcie głównego celu pracy. Na tym etapie Doktorantka podjęła się niezwykle złożonego zadania, które wymagało przyjęcia założeń, niektóre z nich budzą pewne wątpliwości i wymagają uszczegółowienia:

1. Czy ustalenie szerokiego przedziału wiekowego dla populacji dorosłych (18-64 lata), nie jest zbyt dużym uogólnieniem (rodzaj diety, masa ciała)?
2. Czy przyjęte założenia spożycia wyrobów mięsnych tradycyjnie wędzonych odzwierciedlają specyfikę rynku i preferencje konsumentów w województwach małopolskim i podkarpackim?

Ponadto w oparciu o doświadczenie nabyte podczas realizacji pracy doktorskiej chciałabym poznać opinię Doktorantki odnośnie następujących zagadnień:

1. Czy w dobie rosnącej ekspozycji na WWA w pyłe zawieszonym można zaniedbać narażenie konsumenta drogą oddechową? Czy ekspozycja na WWA wzrasta istotnie u palaczy tytoniu?

2. Czy przeprowadzone badania potwierdzają zasadność poszerzenia oceny zanieczyszczenia żywności WWA o dodatkowe związki o niższej toksyczności w porównaniu do oceny opartej na zawartości benzo(a)pirenu?
3. Czy przeprowadzone badania wskazują na konieczność stosowania obniżonego limitu dla pozostałości benzo(a)pirenu i $\Sigma 4$ WWA w tradycyjnie wędzonych wyrobach mięsnych dostępnych na rynku Podkarpacia i Małopolski?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr inż. Alicji Zachara, na którą składa się 5 prac opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych dostarcza nowych informacji nt. skażenia produktów spożywczych dostępnych na rynkach województw podkarpackiego i małopolskiego (do tej pory nieopisane w literaturze) oraz szacunkową ocenę ryzyka narażenia konsumentów polskich na pobranie WWA w diecie złożonej z ww. produktów (dostępne nieliczne i niepełne oceny, np. Wieczorek i Wieczorek 2011). Przeprowadzenie przez Doktorantkę tak rozległych i kompleksowych badań wymagało ogromnego zaangażowania w pracę laboratoryjną, ale także zgłębienia podjętej problematyki zarówno pod względem metodycznym, jak i obowiązujących regulacji prawnych. Wysoki poziom prac opublikowanych na przestrzeni 3 lat, budzi podziw i wskazuje na samodzielność naukową, zdolności organizacyjne, pracowitość i rzetelność badawczą Autorki.

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne jako rzeczywiste zagrożenie występujące w środkach spożywczych* jest oryginalnym rozwiązaniem postawionego problemu naukowego, wnosi istotne elementy do nauki i spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim (zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003r., Dz. Ustaw nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i z przekonaniem wnoszę do Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o dopuszczenie mgr inż. Alicji Zachara do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy recenzowanej rozprawy, pracowitość przeprowadzonych badań oraz wartość naukową opublikowanych prac przedkładam Wysokiej Radzie *wniosek o wyróżnienie powyższej pracy.*

Rzeszów, dnia 16 luty 2018

dr hab. inż. Małgorzata Dżugan, prof. UR

