

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anety Marii Mrozek-Szeteli

nt. „Zastosowanie ozonu do stabilizacji mikrobiologicznej wybranych serii materiałów oraz końcowych produktów – suplementów diety”

wykonanej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Wińskiej, prof. UPWr

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter monografii naukowej i została zrealizowana w ramach projektu „Doktorat Wdrożeniowy”. Podstawą wykonania recenzji była Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 17. 10. 2023 r.

Utrzymanie czystości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego surowców i produktów przeznaczonych do spożywania jest nieodzownym warunkiem wprowadzania do obrotu żywności, suplementów diety i leków. W surowcach i produktach roślinnych zawsze obecne są drobnoustroje, ale ich liczba musi być kontrolowana i jest limitowana odpowiednimi przepisami. W związku z tym surowce roślinne, w tym zioła, zawierające większą niż dopuszczalna liczbę mikroorganizmów, muszą być poddane procesowi dekontaminacji. Proces ten może być przeprowadzony przy zastosowaniu metod fizycznych lub chemicznych. Jednym ze skutecznych chemicznych sposobów usuwania zanieczyszczeń mikrobiologicznych z surowców roślinnych jest traktowanie ich ozonem, którego aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest znana i udokumentowana licznymi badaniami. Ozon zarówno w fazie gazowej, jak i w postaci roztworu wodnego jest wykorzystywany do higienizacji wody i żywności od ponad stu lat, ale badania nad jego zastosowaniem w odniesieniu do ziół są względnie nowe. Wykorzystując ozon należy pamiętać, że jego silny potencjał oksydacyjny może prowadzić do niekorzystnych zmian w produktach przeznaczonych do spożywania, a skuteczność higienizacji zależy od wielu czynników, z których głównymi są rodzaj materiału i obecnych w nim drobnoustrojów. Dlatego warunki ozonowania należy dobierać indywidualnie do każdego materiału roślinnego w taki sposób, by przy osiągnięciu odpowiedniego stopnia czystości mikrobiologicznej zachowane zostało bezpieczeństwo zdrowotne żywności.

Mając świadomość wymienionych uwarunkowań, Pani mgr Aneta Mrozek-Szetela postawiła sobie za zadanie ustalenie warunków dekontaminacji mikrobiologicznej czterech wybranych surowców zielarskich, z wykorzystaniem do tego celu ozonu. Warzywa i owoce mogą być ozonowane zarówno ozonem gazowym, jak i w formie roztworu wodnego, natomiast w przypadku ziół, zwłaszcza tych w postaci ziela, liści lub kwiatów, najlepszym sposobem jest fumigacja. Taki też sposób słusznie wybrała Autorka.

Recenzowana rozprawa została podzielona na rozdziały typowe dla analitycznych prac eksperymentalnych. Całość obejmuje 102 strony i składa się z następujących części: Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel pracy, Badania własne, Wyniki i dyskusja wyników, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia.

Rozdział określony mianem **Wstępu** (str. 11-45) jest faktycznie przeglądem literatury. W tej wieloaspektowej części na początku przedstawiono po krótko rynek suplementów diety, a następnie szerzej omówiono problem zanieczyszczeń mikrobiologicznych surowców roślinnych oraz fizyczne i chemiczne metody dekontaminacji. Szczególną uwagę zwrócono na wykorzystanie w tym procesie ozonu. Przedstawiono historię stosowania ozonu, aspekty bezpieczeństwa i aktywność przeciwdrobnoustrojową wraz z mechanizmem działania ozonu na drobnoustroje. Przegląd literatury kończą informacje na temat czterech wybranych jako przedmiot pracy surowców roślinnych. Część literaturowa wydaje się poprawnie zaplanowana, ale jej realizacja nie jest zadowalająca. Przy omawianiu metod dekontaminacji opis ozonowania został podzielony na dwa fragmenty zamieszczone str. 16-17 i 25-33. Właściwsze byłoby przedstawienie najpierw metod fizycznych, a potem chemicznych, zakończone omówieniem ozonowania. Odczuwam niedostatek informacji na temat wcześniejszych badań dotyczących zastosowania ozonu do dekontaminacji surowców roślinnych, w tym w szczególności ziół, z krytycznym ich omówieniem. Odniesienia do takiej literatury zamieszczone są wprawdzie w różnych częściach pracy, ale są niepełne i dość chaotyczne, w dodatku bez podania odnośników (np. str. 68). Z drugiej strony zbyt wiele jest informacji niezwiązanych z tematyką rozprawy, np. o zastosowaniu ozonu w medycynie. Monografie surowców roślinnych obejmują ich charakterystykę botaniczną i chemiczną oraz działanie lecznicze. Z punktu widzenia użyteczności w rozprawie zbyt lakoniczne są informacje o składnikach chemicznych – zwłaszcza tych ocenianych w badaniach, a zbyt szczegółowo opisano różnorodne zastosowania poszczególnych surowców. O ile Autorka zauważa ograniczenia w stosowaniu preparatów z tataraku ze względu na toksyczność asaronu, to nie znalazłam analogicznej informacji dotyczącej wrotyczu w związku z obecnością w nim tujonów.

Po analizie części literaturowej pojawia się pytanie dlaczego Autorka przedstawiła wyłącznie amerykańskie regulacje dotyczące zastosowania ozonu w żywności, nie odnosząc się do prawa europejskiego i polskiego.

Cel pracy został sformułowany jasno i klarownie. Praca została zrealizowana w odpowiedzi na zapotrzebowanie firmy Wedes Concept Piotr Rejda, w której zatrudniona jest Autorka i w której planowane jest zastosowanie ozonowania do higienizacji surowców służących do produkcji suplementów diety oraz produktów końcowych. Firma dostarczyła również materiał badawczy w postaci trzech mieszanek ziołowo-witaminowych. Pozostałe materiały stanowiły cztery surowce zakupione w firmie zielarskiej Aromatika.

Warto podkreślić, że przy doborze warunków ozonowania uwzględniono z jednej strony skuteczność procesu dekontaminacji, a z drugiej strony wpływ tego procesu na zmiany w zawartości substancji biologicznie aktywnych w badanych materiałach.

Część nazwana **Badania własne** powinna raczej nosić nazwę część eksperymentalna lub materiały i metody (str. 47-53). Wymieniono w niej analizowane surowce i opisano stosowane metody. Warto podkreślić, że wśród surowców znalazły się różne części botaniczne roślin: kwiatostan rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.), ziele wrotyczu pospolitego (*Tanacetum vulgare* L.), owoc kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare* L.) i kłącze tataraku (*Acorus calamus* L.). Metody analizy mikrobiologicznej i chemicznej zostały dobrane poprawnie. Czystość mikrobiologiczną określano przez oznaczenie obecności ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych, liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz liczby drożdży i pleśni. Skład olejków eterycznych analizowano metodą GC-MS. Zawartość polifenoli ogółem oznaczono metodą spektrofotometryczną, a wybranych związków z tej grupy metodą LC-MS. Ponadto oceniono dwiema metodami spektrofotometrycznymi (DPPH i ABTS) potencjał antyoksydacyjny ekstraktów metanolowych z surowców. Wszystkie analizy wykonano dla materiałów wyjściowych i po procesie higienizacji. Opis metodyki powinien być zbiorem przepisów, pozwalających na odtworzenie eksperymentów. Ten warunek nie został spełniony. Opis jest zbyt lakoniczny i zawiera liczne niedomówienia oraz nieścisłości.

Przedstawię najważniejsze z nich z prośbą o wyjaśnienie:

- Autorka podaje, że „Proces dekontaminacji przeprowadzono w reaktorze w sposób ciągły”. Na czym polegała ciągłość procesu? Czy nie chodziło raczej o to, że proces prowadzono przy ciągłym przepływie ozonu?
- Fragment „Wyjściowa próbka zawierała 120 g suchej masy.” Czy rzeczywiście ilość próbki była podawana jako sucha masa? Byłoby to nietypowe. Poza tym nie widzę metody oznaczania suchej masy.

- W jakich warunkach przechowywano materiał między kolejnymi etapami ozonowania?
- W ilu powtórzeniach wykonano destylację z parą wodną surowców w celu otrzymania olejków eterycznych i w jaki sposób określono ich zawartość? W metodzie z użyciem wzorca podaje się zawartość olejku eterycznego i składników w jednostkach masy, a w pracy wyrażono te wartości w procentach. Nie podano odnośnika literaturowego do metody, a zamiast tego jest dopisek: „wg publikacji”.
- Czy rzeczywiście oznaczano suchą masę ekstraktu w metodach DPPH i ABTS i czy była taka potrzeba, skoro wyniki podawano w $\mu\text{g/ml}$ (w domyśle ekstraktu)?
- Jaki cel miało wyznaczanie krzywych kalibracyjnych wzorców w analizie LC-MS ekstraktów, skoro zmiany zawartości wybranych związków polifenolowych oszacowano na podstawie porównania pól powierzchni pików na chromatogramach próbek kontrolnych i po procesie dekontaminacji?

Ze względu na to, że badania miały charakter porównawczy i wszystkie wyniki odnoszono do prób kontrolnych materiału przed dekontaminacją, akceptuję pewne przyjęte przez Autorkę uproszczenia w analityce, których nie będę tu wymieniać.

Uzupełnienia w części doświadczalnej wymagają takie dane jak: poza stężeniem ozonu (określanym czasem błędnie jako natężenie) należało podać szybkość przepływu gazu; opis surowców powinien być uzupełniony o sposób ich przygotowania do ozonowania i oznaczeń chemicznych: czy surowce, zwłaszcza owoce i kłącze były wcześniej rozdrabniane? nie wiadomo czy druga ekstrakcja materiału roślinnego była wykonywana z użyciem świeżej czy tej samej porcji rozpuszczalnika oraz do jakiej objętości uzupełniano ekstrakt. Korekty zaś wymagają: temperatura inkubacji płytek, którą na str. 50 określono jako 30°C , a na str. 56 jako $15\text{-}25^{\circ}\text{C}$ oraz stwierdzenie na str. 52 „Przykładowe parametry MRM podano w Tabeli 1”.

Rozdział **Wyniki i dyskusja wyników** (str. 54-88) rozpoczyna się przekonującym uzasadnieniem wyboru fumigacji gazowym ozonem jako metody dekontaminacji ziół. Zasadniczą część tego rozdziału zajmują wyniki analiz mikrobiologicznych i chemicznych czterech surowców roślinnych, które przedstawiono w 27 tabelach i na 19 rysunkach. Cykl 18 wariantów ozonowania każdego z surowców zaplanowano w oparciu o jedną publikację (z której skopiowano schemat aparatury). Na podstawie wstępnych prac dokonano autorskiej modyfikacji miejsca wprowadzania gazu do reaktora oraz warunków procesu, w tym stężenia ozonu, czasu ozonowania i liczby cykli. Proces ozonowania surowców prowadzono trzema stężeniami ozonu (10 mg/m^3 , 50 mg/m^3 i 100 mg/m^3), w cyklach trwających 30 lub 60 minut, powtarzanych trzykrotnie w odstępach 24-godzinnych. Zawartość trzech grup drobnoustrojów oraz charakterystykę chemiczną surowców po ozonowaniu zestawiono z odpowiednimi wartościami dla surowców przed ozonowaniem, które stanowiły próbki kontrolne. Rozdział

zakończony jest omówieniem wyników analizy trzech mieszanek ziołowo-witaminowych ozonowanych w wybranych warunkach.

Sposób zaprojektowania doświadczeń uważam za logiczny, a ich wykonanie za kompletne. Mam jednak wiele zastrzeżeń do opisu. Głównym zarzutem jest brak opracowania statystycznego wyników, uniemożliwiający właściwe ich omówienie i wyciągnięcie wniosków. W żadnej z analiz nie określono istotności statystycznej różnic, a w analizie drobnoustrojów i olejków eterycznych nie podano nawet odchylenia standardowego.

Wszystkie próbki (18 wariantów dla każdego surowca) poddano analizie mikrobiologicznej, a próbki otrzymane po trzech cyklach ozonowania (sześć wariantów dla każdego surowca) również analizie chemicznej. Uzyskane wyniki pokazały, że po pierwsze podczas procesu ozonowania w zaproponowanych warunkach nastąpiło skuteczne obniżenie ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych, liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz liczby drożdży i pleśni, a efektem było uzyskanie pożądanej czystości mikrobiologicznej surowców, przy nieznacznie zmienionej zawartości analizowanych związków. Wyjątkiem było kłącze tataraku, w którym obserwowano istotne zmiany w zawartości i profilu chemicznym olejku eterycznego. Co więcej, efekt dekontaminacji tego surowca Autorka oceniła jako najmniej zadowalający. Po drugie wyniki uzyskane w rozprawie są zgodne z danymi literaturowymi, wskazującymi na konieczność doboru warunków higienizacji dla każdego z materiałów indywidualnie, z uwzględnieniem wyjściowej liczby drobnoustrojów oraz zmian w zawartości związków biologicznie aktywnych.

Interesująco przedstawiają się wyniki oznaczenia zawartości polifenoli ogółem i wybranych związków z tej grupy, zwłaszcza w zestawieniu z aktywnością przeciwutleniającą. O ile zawartość polifenoli ogółem w próbkach po ozonowaniu pozostawała zwykle na niewiele zmienionym poziomie lub była nieco niższa niż w próbkach kontrolnych, to ozonowanie powodowało często zwiększenie aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów, choć tendencje zmian były różne dla dwóch zastosowanych metod (DPPH i ABTS).

Słabym punktem rozprawy jest zaledwie szczątkowa dyskusja uzyskanych wyników oraz brak dyskusji wyników badań własnych na tle dotychczasowych badań. Dyskusja wyników jest trudna z powodu niedostatecznej analizy statystycznej, niemniej jednak pewne odniesienia do wcześniejszej literatury dotyczącej dekontaminacji surowców zielarskich powinny być poczynione, ze wskazaniem pozycji piśmiennictwa. W jedynej zauważonej przeze mnie próbie podjętej na str. 70 niewłaściwie podano odnośnik do literatury.

Końcowym etapem pracy było ozonowanie trzech gotowych mieszanek ziołowo-witaminowych dostarczonych przez producenta. Po analizie poprzednich wyników badań

Autorka słusznie zrezygnowała z mało skutecznego najniższego stężenia ozonu. Według opisu doświadczenia liczba wariantów procesu dla każdej mieszanki wynosiła 12 (dwa stężenia, dwie wartości temperatury, trzy cykle). Jednak z danych przedstawionych w tabelach 27-29 wynika, że liczba wariantów wynosiła sześć: skuteczność higienizacji przedstawiono dla stężenia ozonu 50 mg/m^3 w trzech cyklach po 60 minut, a dla stężenia 100 mg/m^3 w trzech cyklach po 30 minut. To ograniczenie było moim zdaniem uzasadnione. Niełatwo wyciągnąć wnioski z tych doświadczeń, jako że (poza brakiem statystyki) w tabelach ewidentnie są błędy, które nie zostały skomentowane przez Autorkę. Trudno uwierzyć, że po pierwszym cyklu ozonowania liczba drobnoustrojów wynosiła zero, a po kolejnych miała wartości rzędu 10^2 - 10^4 jtk (tabele 27 i 28). Jeszcze trudniej wyjaśnić sytuację, gdy w materiale wyjściowym nie stwierdzono drobnoustrojów, a mimo to w próbkach po ozonowaniu były one obecne (tabela 28). Ponadto zagadkowe są przedstawione w tabeli 29 wyniki analizy mieszanki ze wskazaniem do stosowania jako środek wspomagający układ odpornościowy. Autorka stwierdziła, że nie było w niej drobnoustrojów i ozonowanie nie było konieczne, ale w tabeli 29 zamieściła wyniki wskazujące, że po ozonowaniu pojawiły się drobnoustroje tlenowe. Poproszę Autorkę o komentarz do tych wyników, a także ustosunkowanie się do następujących uwag:

- Proszę o wskazanie właściwego odnośnika literaturowego do wykresu przedstawionego na Rysunku 26. Zacytowana pozycja 17 odnosi się do nasion kardamonu. W kolejnej cytowanej w rozprawie pozycji 210 tych samych autorów wymienione są wprawdzie owoce jałowca, ale zgoła inne są wartości stężenia ozonu, a aktywność przeciwutleniająca nie była badana.
- Reaktor jest niewłaściwie opisany jako „prostokątne naczynie szklane” (str. 49) lub „perforowane naczynie” (str. 55 i 87). Domyślam się, że perforowana była przegroda, na której umieszczano materiał. Jeśli tak, to proszę o wyjaśnienie, jak na niej umieszczano produkty gotowe, które miały formę proszków.
- Chciałabym podkreślić, że identyfikacji składników wszystkich olejków eterycznych dokonano poprawnie, a drobne uchybienia w nazwach (podobnie jak w przypadku związków polifenolowych) są nieliczne. Proszę jednak o sprecyzowanie, jaki związek chemiczny kryje się pod nazwą „dehydroksyizokalamendiol”.

Przedstawię również kilka uwag do opisu wyników i dyskusji, które nie wymagają odpowiedzi Autorki:

- Potencjał przeciwutleniający surowców roślinnych wynika w głównej mierze z obecności w nich związków polifenolowych. Dlatego bardziej logiczne byłoby wspólne przedstawienie dla każdego z surowców zawartości polifenoli ogółem i wyników obu

oznaczeń spektrofotometrycznych (ABTS i DPPH) oraz próba odnalezienia korelacji między wymienionymi wartościami. Należało również zadbać o taką samą kolejność wymieniania czterech surowców w każdym rozdziale, włącznie z częścią literaturową.

- Nie ma potrzeby przedstawiania tych samych wyników równocześnie w formie tabelaryzowanej i w postaci wykresów w tym samym miejscu. Skumulowanie wszystkich wykresów mogłoby posłużyć do dyskusji różnic między surowcami.
- Tytuły tabel 3-6 są niewłaściwe (nie prowadzono badań przeciwdrobnoustrojowych), brak jest jednostki, w której podano wyniki, symbolu „NB” wyjaśnionego w legendzie nie ma w tabelach. Tytuły tabel 11-22 i odpowiadających im rysunków powinny zostać skorygowane przez usunięcie słowa „oznaczenie”. Aby oddać rację Autorce dodam, że analogiczne do tabel 3-6 tabele 27-29 mają tytuły poprawne, symbol „NB” jest użyty, jednostki podano, ale niestety niewłaściwie. Z opisu metodyki wynika, że oznaczano liczbę drobnoustrojów w 1 g materiału, dlaczego zatem podano wynik jako CFU/ml? Skrót CFU powinien być wyjaśniony, choć w języku polskim funkcjonuje skrót jtk.
- W tytule rozdziału 6.5. oraz tytułach tabel i wykresów w nim zawartych słowa „związków fenolowych” powinny być zastąpione „polifenoli”.

W ostatnim rozdziale zatytułowanym **Podsumowanie i wnioski** (str. 87-88) Autorka bardzo krótko, choć adekwatnie podsumowała wyniki. Na uwagę zasługuje fakt, że na podstawie Jej badań w firmie Wedes Concept Piotr Rejda opracowano i wdrożono metodę dekontaminacji ozonem mieszanek witaminowo-ziołowych. Zatem należy uznać, że cel pracy został zrealizowany.

Bibliografia obejmuje 220 pozycji, pochodzących w większości z ostatnich 20 lat. Jak pisałam wcześniej, nie wszystkie są właściwie dobrane. Brakuje istotnych pozycji z zakresu rozprawy, a liczba zbędnych odnośników w mojej opinii mogłaby być znacznie ograniczona bez szkody dla jakości rozprawy.

Rozprawa została napisana bardzo niestarannie i chaotycznie. Wszystkie jej części zawierają uchybienia merytoryczne i nieścisłości. Liczba błędów stylistycznych, gramatycznych i interpunkcyjnych powoduje, że rozprawę trudno się czyta. Natomiast liczba literówek świadczy o braku korekty. Dbłość o czystość języka polskiego powinna cechować każdą osobę posługującą się nim. Zaś umiejętność zrozumiałego opisanie badań oraz starannej redakcji tekstu naukowego jest nieodzowną cechą każdego badacza. Z obowiązku recenzentki wymienię jeszcze niektóre z niedociągnięć, w nadziei, że pomogą Autorce w przyszłej pracy.

Przykłady błędów merytorycznych: cytowania pozycji piśmiennictwa numer 19 (drugie na str. 12 oraz na str. 17) są niewłaściwe; na str. 14 zapowiedziano opis budowy i funkcji

roślinnego układu odpornościowego, którego brak, ale też nie jest tu potrzebny; Enterobacterales to rząd nie rodzina; rodzina obrazkowate (*Araceae*) to nie to samo co tatarakowate (*Acoraceae*); niewłaściwe jest kilkakrotne nazywanie olejku eterycznego olejkiem esencjonalnym; po destylacji otrzymano olejek eteryczny rozpuszczony, nie zawieszony w cykloheksanie; niewłaściwie stosowano określenie „ilość” zamiast „liczba” do rzeczowników policzalnych, np. cykli, drobnoustrojów. Przykłady powtarzających się literówek: w liczbach dziesiętnych kropka i przecinek stosowane są naprzemiennie; nazwy łacińskie organizmów nie zawsze są pisane kursywą.

Podsumowując moją ocenę recenzowanej pracy stwierdzam, że Pani mgr Aneta Mrozek-Szetela zapoznała się z literaturą przedmiotu i na tej podstawie poprawnie sformułowała cel i zakres badań oraz w usystematyzowany sposób przeprowadziła liczne zaplanowane eksperymenty i przejrzysto przedstawiła ich wyniki. Autorka zaprezentowała w rozprawie ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie technologia żywności i żywienia oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Niedostatki w omówieniu wyników, ich dyskusji oraz opracowaniu rozprawy nie umniejszają potencjalnej praktycznej wartości uzyskanych wyników badań naukowych, które już znalazły zastosowanie w sferze gospodarczej. Pomimo wskazanych w recenzji niedociągnięć pozytywnie oceniam badania przeprowadzone przez mgr Anetę Mrozek-Szetelę i doceniam znaczenie osiągniętych wyników.

Recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2023, poz. 742 ze zm.). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Anety Marii Mrozek-Szeteli do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

prof. dr hab. Danuta Kalemba