

Prof. dr hab. Kinga Mazurkiewicz-Zapałowicz, prof. zw.
Katedra Hydrobiologii, Ichtologii i Biotechnologii Rozrodu
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr IWONY AŁTYN

pt: *Analiza substancji niepożądanych — wtórnych metabolitów grzybów pleśniowych w surowcach roślinnych oraz otrzymywanych z nich suplementów diety*

wykonanej w Katedrze Fizjologii i Toksykologii, na Wydziale Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego W Bydgoszcy
pod kierunkiem promotora dr hab. Magdaleny Twarużek, prof. uczelni

Recenzję sporządzono na podstawie dokumentacji przesłanej przez Przewodniczącą Rady
Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszcy,
dr ha. Igora Chybickiego, prof. uczelni

Mgr IWONA AŁTYN od 01.07.2019 roku jest zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Fizjologii i Toksykologii, Wydziału Nauk Biologicznych UKW w Bydgoszcy. Wcześniej była również słuchaczką Studiów Doktoranckich tej Uczelni. Dorobek publikacyjny Kandydatki jest bardzo imponujący. W latach 2017-2021 opublikowała 12 prac naukowych ściśle związanych z tematyką badawczą, które ukazały się w czasopismach z listy A wykazu MNiSW. Łączna punktacja tych publikacji to 507 pkt., a IF – 48,983. Kandydatka uczestniczyła także w 10. konferencjach międzynarodowych, w czasie których wygłaszała referaty (2) i prezentowała postery (8), brała też czynny udział w 13 konferencjach krajowych. Pani Magister była i jest, bardzo zaangażowana w realizacji projektów naukowych, w 3. z nich była wykonawcą a w 2. kierownikiem. Uczestniczyła w licznych (32) szkoleniach naukowych dotyczących wykorzystania nowatorskich metod w badaniach biochemicznych i toksykologicznych. Za swoje osiągnięcia naukowo-badawcze została wielokrotnie wyróżniana i nagradzana. Godnym podkreślenia jest zaangażowanie Pani mgr Iwony AŁTYN w działalności organizacyjnej w UKW i poza Uczelnią.

Trafność wyboru problemu badawczego i tematu rozprawy

Rosnące zainteresowanie konsumentów naturalnymi, roślinnymi suplementami diety zmusza przemysł biofarmaceutyczny i zielarski nie tylko do ciągłego wzbogacania asortymentu, ale także podniesienia jego atrakcyjności. W dobie coraz większej świadomości społecznej oraz mody na tzw. zdrowy styl życia, owa atrakcyjność suplementów utożsamiana jest przede wszystkim z poprawą jakości zarówno surowców jak i wytwarzanych z nich produktów, które jako element wspomagający żywność funkcjonalną powinny mieć cechy prozdrowotne. Tymczasem niewłaściwe warunki transportu i przechowywania surowców roślinnych i opartych na ich bazie produktów, stwarzają ryzyko rozwoju mikroorganizmów, w tym grzybów toksynotwórczych. Grzyby te stanowią przyczynę nie tylko wymiernych, poważnych strat ekonomicznych, ale są także potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia konsumentów. O ile surowce i produkty stanowiące tzw. żywność podstawą są badane powszechnie pod kątem toksykologicznym, a ich dostęp na rynek jest regulowany obowiązującymi normami, tak kontrola produktów zielarskich pozostawia w tym zakresie wiele do życzenia.

Stąd też podjęcie przez Doktorantkę problemu związanego z poznaniem zróżnicowania mykologicznego i mykotoksykologicznego różnych roślinnych suplementów diety oraz ocenę zagrożenia spowodowanego przez to biologiczne zanieczyszczenie dla konsumentów (często także pacjentów) uważam za bardzo ważne i uzasadnione. Tym bardziej, że wyniki badań Kandydatki są bezdyskusyjnie jednoznaczne, ze względu na wykorzystanie najbardziej efektywnych metod i najnowocześniejszej aparatury ze spektrometrii mas. Fakt ten m.in. upoważnia do uznania otrzymanych wyników jako mocnego argumentu, stanowiącego niepodważalny dowód na konieczność wprowadzenia monitorowania obecności grzybów i mykotoksyn w roślinnych suplementach diety. Jednocześnie jest to element aplikacyjnego aspektu podjętych badań. Godnym podkreślenia jest też fakt, że zainicjowana przez Doktorantkę problematyka wychodzi naprzeciw oczekiwaniom nie tylko producentów czy służb kontroli jakości ale także przeciętnego konsumenta.

Cel pracy

Cel pracy sformułowano poprawnie, wyraźnie wyznaczając w nim kierunki badań. Poza priorytetem oceniającym ryzyko narażenia konsumentów na skutki obecności patogennych

grzybów pleśniowych i ich mykotoksyn w suplementach diety, wyznaczono także cele cząstkowe, stanowiące podstawę realizacji celu głównego. Tak więc, uznano za konieczne, zidentyfikować:

- zagrożenia związane z potencjalną obecnością grzybów w próbkach surowców roślinnych oraz suplementach diety (zgodnie z metodą PN-R-87028:1996);
- wybrane mykotoksyny oraz oznaczyć poziom ich stężenia w próbkach surowców roślinnych i suplementach diety, przy wykorzystaniu wysokoselektywnych technik analitycznych.

Wybór powyższych celów uważam za słuszny i uzasadniony dotychczasowym stanem wiedzy, który w tym zakresie jest bardzo fragmentaryczny, a jednak niezwykle istotny z punktu widzenia praktyki przemysłu zielarskiego.

Formalna ocena rozprawy – układ, informacje o poszczególnych częściach

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest pracą o charakterze eksperymentalnym i układzie zwyczajowym dla tego typu opracowań naukowych. Dysertacja obejmuje 266 str., na które składają się: Spis treści (3 str.); Wykaz skrótów i akronimów (4 str.); Wstęp (2 str.); Część teoretyczna (54 str.) z 5. rozdziałami; Część doświadczalna (82 str.) z 3. rozdziałami obejmującymi Materiał, Metody i Wyniki; Dyskusja (6 str.); Wnioski końcowe (1 str.); Bibliografia (23 str.); Spis rycin, tabel i wykresów (4 str.) oraz Załączniki (74 str.). Układ maszynopisu jest przejrzysty i logiczny, a konkretne rozdziały zawierają typowe dla nich treści.

Ocena merytoryczna pracy

Rozdziały dotyczące **Części teoretycznej** rozprawy zostały przygotowane bardzo starannie i opracowane na podstawie wyczerpującego i bogatego przeglądu właściwie, dobranego i bardzo aktualnego piśmiennictwa. W tej części scharakteryzowano potencjalne zanieczyszczenia suplementów diety przez różne rodzaje i gatunki mykobiota oraz wytwarzane przez nie mykotoksyny, a także zalecenia związane z obecnością grzybów pleśniowych. Dużo uwagi poświęcono ogólnym zasadom prawa żywnościowego i aktualnym przepisom polskim i unijnym, gwarantującym bezpieczeństwo żywności. Scharakteryzowano dekalog suplementacji i rynek suplementów diety.

W **Części doświadczalnej** rozprawy szczegółowo opisano i uzasadniono dobór bardzo bogatego **MATERIAŁU BADAWCZEGO**, w którym wykorzystano 290 próbek suplementów diety, 10. gatunków roślin o właściwościach prozdrowotnych (błonnik i babka płesznik, głóg dwuszyjkowy, korzeń maca, czerwony ryż drożdżowy, ostropest plamisty, pyłek pszczeleli, soja, stewia, wierzbownica drobnokwiatowa, zielony jęczmień) stosowanych w różnych formach (nasiona, owoce, susz, proszek, kapsułki, tabletki, granulki, kryształki i płyn).

W opisie **METOD** przedstawiono tradycyjnie przyjęte, konwencjonalne etapy postępowania przy oznaczaniu ogólnej liczby kolonii grzybów (jtk/g) oraz sposoby przygotowania preparatów do ich identyfikacji. **Warto uzupełnić tę część opisu metod o klucze wykorzystane do oznaczania izolatów poszczególnych taksonów. Niejasne są także informacje o kryteriach dotyczących sposobu wyboru materiału (grzybów i mykotoksyn) do analizy statystycznej. Wskazane byłoby także przedstawienie zasadności doboru wykorzystanych testów analizy statystycznej.**

Badania mykotoksykologiczne związane z identyfikacją i oznaczeniem poziomu stężenia mykotoksyn (aflatoksyn, ochratoksyn, trichotecenów i zearalenonu, patuliny i cytryniny) oparto na właściwych i nie budzących zastrzeżeń, standardowych metodach, przy wykorzystaniu wysokoselektywnych technik analitycznych.

W rozdziale **WYNIKI** – Autorka przeprowadziła szczegółową i wyczerpującą analizę mykologiczną oraz mykotoksykologiczną. Na tym tle opis wyników dotyczących analizy statystycznej, zawarty w trzeciej części rozdziału, jest bardziej schematyczny i powierzchowny.

W analizie mykologicznej podkreślono zróżnicowanie częstości występowania grzybów pleśniowych zależnie od gatunku rośliny stanowiącej bazę suplementu diety. Powszechną obecność grzybów pleśniowych (100% prób) stwierdzono w suplementach na bazie wierzbownicy drobnokwiatowej. Bardzo często (92-95% prób) pojawiały się one w suplementach z ostropestem plamistym, głogiem dwuszyjkowym, korzeniem maca i pyłkiem pszczelim, a często (78-79%) w suplementach błonnika i babki płesznik, soi i jęczmienia zielonego. Najrzadziej, jednak na poziomie 40% prób, grzyby pleśniowe występowały na produktach czerwonego ryżu drożdżowego. Stwierdzono również, że w próbkach wszystkich suplementów procent skażenia grzybami pleśniowymi był większy aniżeli drożdżami, odpowiednio: 81 i 58%. Podobna zależność dotyczyła ogólnej liczby grzybów pleśniowych,

których było więcej niż grzybów drożdżoidalnych ($1,0 \times 10^4$ vs $5,8 \times 10^3$). Zróżnicowanie taksonomiczne grzybów zidentyfikowanych w badanych suplementach diety wykazało obecność 1 grzybnicy sterylnej i 13. rodzajów mycobiota, z dominującym udziałem przedstawicieli *Eurotium* (35%). Natomiast udział gatunków *Aspergillus* i *Penicillium* w bioróżnorodności był niższy i wynosił odpowiednio: 15 i 13%.

Badania udowodniły, że częstość występowania grzybów w suplementach diety zależy także od formy ich użytkowania. I tak, ich obecność stwierdzano we wszystkich próbkach owoców, granulek i suszu. Suplementy oparte na suszu wykazały dodatkowo największą średnią liczbę kolonii grzybów i grzybów pleśniowych. Natomiast obecność drożdży zdominowała suplementy oparte na granulatach. Kapsułki, tabletki i kryształki wyróżniały się najmniejszą średnią liczbą kolonii wszystkich trzech grup mikroorganizmów (grzybów, grzybów pleśniowych i drożdży), co jest istotnym spostrzeżeniem w kontekście dużej popularności przyjmowania tych form suplementów. W interpretacji wyników dotyczących analizy mykologicznej Autorka zwróciła uwagę na zróżnicowanie bogactwa taksonomicznego grzybów pleśniowych, które było największe w suplementach wierzbownicy drobnokwiatowej i stewii (13 i 10 rodzajów) a najmniejsze w próbach czerwonego ryżu drożdżowego, soi i jęczmienia zielonego (3; 5 i 6 rodzajów).

W mykologicznej analizie ilościowej, dotyczącej średniej ogólnej liczby jtk/g grzybów pleśniowych wykazano, że najwyższa wartość tego wskaźnika charakteryzowała próby wierzbownicy drobnokwiatowej, ostropestu plamistego i stewii (odpowiednio: $4,0 \times 10^4$; $2,1 \times 10^4$; $1,2 \times 10^4$), podczas gdy w odniesieniu do drożdży najwyższą średnią wartość jtk/g udowodniono w próbach ostropestu i pyłku pszczelego ($1,8 \times 10^4$ i $1,4 \times 10^4$). Natomiast najniższe średnie wartości jtk/g, dla ogólnej liczby pleśni wyróżniały suplementy na bazie korzenia macy, soi oraz błonnika i babki płesznik ($1,1 \times 10^2$, $1,3 \times 10^2$ oraz $5,6 \times 10^2$), a w odniesieniu do drożdży parametr ten był najniższy w suplementach czerwonego ryżu drożdżowego i korzenia maca ($3,0 \times 10$ i $5,9 \times 10$).

Analiza mykotoksykologiczna wykazała obecność mykotoksyn w 61% próbek oraz 100% skażenia suplementów ostropestu plamistego i soi. Mykotoksyny stwierdzano także we wszystkich suplementach owoców, nieco rzadziej w próbkach nasion, suszu i proszku (80 i 76%), natomiast najrzadziej w kryształkach i granulkach (30 i 22%). Wolna od tych metabolitów była jedynie forma płynna suplementów. Duże znaczenie poznawcze mają efekty badań

dotyczące stężenia 10. analizowanych mykotoksyn (DON, NIV, 3AcDON, MAS, DAS, T-2, HT-2, ZEN, OTA, AF, PAT i CIT) w suplementach. Ten podrozdział, wyróżniający się mnogością i różnorodnością wyników, które Doktorantka przedstawiła w bardzo zwartej formie graficznej jest trudny dla czytelnika. Fakt ten wiąże się ze zmniejszeniem czytelności (mała wielkość czcionki) a także ryzykiem pomyłek w opisie danych, przed czym Doktorantka się nie uchroniła i błędnie odczytała dane z wykresów 46-48. **Mam nadzieję, że w autoreferacie i prezentacji te edytorskie błędy zostaną skorygowane.**

Bardzo znamienna i ważna z praktycznego punktu widzenia jest dokonana przez Autorkę analiza współwystępowania mykotoksyn w suplementach diety. Wyniki te wskazują, że podobnie do innych środków żywności, zanieczyszczone suplementy charakteryzują się jednoczesną obecnością kompleksu mykotoksyn. W badaniach Doktorantki, najczęściej stwierdzono występowanie dwóch oraz 6. i więcej tych związków. Najwięcej, bo 10 mykotoksyn było obecnych w suplementach na bazie błonnika i babki płesznik, natomiast zanieczyszczenie 8. mykotoksynami pojawiało się w suplementach ostropestu plamistego, pyłku pszczelego, stewii i wierzbowicy drobnokwiatowej. Jedynie w preparatach opartych na bazie czerwonego ryżu drożdżowego nie stwierdzono obecności żadnej mykotoksyny. We wszystkich formach użytkowania suplementów błonnika i babki płesznik wystąpiły toksyny: ZEN, HT-2 i T-2; ostropestu plamistego: DON, NIV, DAS, T-2, HT-2 i ZEN, a pyłku pszczelego i stewii tylko ZEN. Mykotoksynę ZEN identyfikowano także we wszystkich próbkach kapsułek i tabletek na bazie jęczmienia zielonego oraz łącznie z T-2 toksyną w tabletkach wierzbowicy drobnokwiatowej, natomiast OTA stwierdzono we wszystkich formach użytkowania korzenia maca i kapsułkach soi.

Poza głogiem (gdzie oceniano jedynie patulinę) i czerwonym ryżem drożdżowym (gdzie oceniano cytryninę), najmniejsze zróżnicowanie mykotoksyn stwierdzono w suplementach jęczmienia zielonego oraz soi, odpowiednio po 5 i 6 tych metabolitów. DON i ZEN to mykotoksyny, które stwierdzono w suplementach wszystkich roślin, T-2 i HT-2 toksyny nie stwierdzono jedynie na stewii, natomiast AF zidentyfikowano jedynie w preparatach pyłku pszczelego, błonnika i babki płesznik oraz stewii, a 3AcDON w suplementach z błonnikiem i babką płesznik oraz stewią.

Podrozdział analiza statystyczna jest bardzo problematyczny w ocenie, ponieważ z jednej strony przedstawia ciekawą i oryginalną interpretację wyników uzyskanych przy

wykorzystaniu analiz korelacji i interkorelacji rang ρ Spearmana, z drugiej strony wyniki te są „niespodzianką”, ponieważ pojawiają się tutaj zmienne „pozornie znikąd”. **Zmienne, które wykorzystano do tych analiz umieszczono bowiem w tabelach (1-4) stanowiących Załącznik 11, zamiast w tekście głównym pracy.** Wątpliwości rozwiązałaby jedna tabela umieszczona w tekście głównym w rozdziale WYNIKI, ze **wszystkimi** rodzajami mikroorganizmów (=mikrobiota; mycobiota) wyizolowanymi z surowca (susz, nasiona, owoc, proszek) i produktów (tabletki, kapsułki, kryształki, granulki, płyn).

Wprawdzie analiza korelacji i interkorelacji rang ρ Spearmana w zdecydowanej większości wykazała słabą siłę związków pomiędzy badanymi zmiennymi, ale stwierdzono przecież też związki istotne (umiarkowane), bądź nawet wysoce istotne (mocne). Te ostatnie to np. stymulacja wzrostu zawartości jednej mykotoksyny przez drugą (NIV-MAS; MAS-DAS i T-2 - HT2). Ponadto ciekawe są wykazane przez Autorkę korelacje negatywne (ujemne), ujawniające wpływ wzrastającego poziomu T-2, HT-2 i ZEN na redukcję poziomu AF. Wyniki te stanowią niezwykle ciekawy fragment badań, w kontekście udowodnionego przez Doktorantkę jednoczesnego współwystępowania metabolitów wtórnych w próbkach, i można przypuszczać, że będą przyczynkiem do dalszych dociekań empirycznych.

DYSKUSJA jest poprowadzona merytorycznie, choć chciałabym zwrócić uwagę na proporcjonalnie mało rozbudowane treści tego rozdziału, w stosunku do innych rozdziałów. Wynika to zapewne z bardzo skromnego i prawie symbolicznego piśmiennictwa odnoszącego się *stricte* do zakresu przeprowadzonych badań. Może jest to świadomie podjęta, słuszna decyzja (pozwalająca uchronić się przed „przegadaniem” tego rozdziału), ale w kilku fragmentach brakowało mi powołania się na znane dane, które mogłyby stanowić ciekawe tło dyskusji. Takie poszerzenie ram dyskusji pozwoliłoby z jednej strony wykazać jak dużo badań toksykologicznych wykonano dotychczas w odniesieniu do innych środków spożywczych, a z drugiej strony unaocznic, jak ważnym i potrzebnym uzupełnieniem tej wiedzy są badania własne Doktorantki, odnoszące się do skażenia roślinnych suplementów diety. Jednak rozumiem, że specyfika materiału badawczego wybranego przez Doktorantkę, jest mało popularna nie tylko w Polsce ale także w świecie, co jest przyczyną obiektywną i może usprawiedliwiać lakoniczny wydźwięk dyskusji. Mimo wszystko szkoda, że Doktorantka zrezygnowała z interpretacji wyników, przecież bardzo interesujących i stanowiących *novum*, czyli ustalenia związków pomiędzy zawartością poszczególnych grzybów oraz zawartością

grzybów i zawartością mykotoksyn w surowcach oraz produktach stanowiących suplementy diety. Bibliografia w tym zakresie jest bardzo fragmentaryczna, co dawałoby Doktorantce możliwości oryginalnej dyskusji. **Mam nadzieję, że odniesie się do tej uwagi przy przygotowaniu autoreferatu. Na obecnym etapie chciałabym poznać opinię Doktorantki, o ewentualnym znaczeniu takich działań synergistycznych i inhibicyjnych.**

Na podstawie otrzymanych wyników Autorka właściwie sformułowała 6 obszernych *WNIOSKÓW*, które łączą się *a posteriori* z wynikami. Każdy z nich dostarcza argumentów, wskazujących na konieczność wprowadzenia powszechnej kontroli mykologicznej i mykotoksykologicznej asortymentu roślinnego wykorzystanego do produkcji różnych form użytkowych suplementów diety.

BIBLIOGRAFIA zawiera imponującą (niespotykaną w rozprawach doktorskich) liczbę ponad 470 pozycji, dobrze dobranych i w zdecydowanej większości prawidłowo wykorzystanych przy redagowaniu rozprawy.

Recenzowana rozprawa doktorska, oprócz dużych walorów posiada pewne usterki i niedociągnięcia, głównie edytorskie, które jednak nie obniżają istotnie jej wartości, a są nimi:

- powtórzenie danych wykresu 9 w wykresie 10, z którego można zrezygnować;
- błędna interpretacja wyników wykresu 12 (jest w tekście odniesienie do owoców, podczas gdy wykres wskazuje na susz); podobne niezgodności dotyczą wykresów 46; 47 i 49 oraz danych w tabeli 15, które nie zgadzają się z tymi podawanymi w tekście;
- brak cytowania kilku pozycji publikacji z bibliografii w tekście głównym np.: Ali i in. 2003, Aliyazicioglu i in. 2005, Bojarowicz, Dźwigulska 2021; Bolechowa i in. 2015; Gonzales i in. 2014; Li i in. 2012; Piacentini in. 2015; 2019; Tan i in. 2011;
- kilka błędów dotyczących niezgodności roku wydania publikacji umieszczonej w bibliografii, z rokiem cytowanym w tekście, choć przy tak licznej bibliografii takie drobne pomyłki są nieuniknione;
- w przypadku gdy ci sami autorzy publikowali w jednym roku kilka publikacji, należałoby zgodnie z Polską Normą wprowadzić oznaczenia tych publikacji literami a; b; c; np. Zhang i in. 2016; Zhang i in., 2016a; Zhang i in. 2016 b oraz Li i in.2007; Li i in.2007a.

PODSUMOWANIE

Praca jest wykonana starannie, na dobrym poziomie technicznym, poprawna stylistycznie, zrozumiała i przekonująca. Zamieszczone tabele korespondują z treścią i są czytelne, wykresy obrazują szereg zależności, co spowodowało wspomniane wcześniej drobne „potnięcia” (chyba nieuniknione, przy tak dużej liczbie danych). Tekst zawiera bogate słownictwo specjalistyczne, którym Doktorantka potrafi się swobodnie posługiwać. Zróżnicowanie roślinnego i mykologicznego materiału badawczego, a także imponująca liczba testowanych metabolitów wtórnych, obsługa wysoce specjalistycznej aparatury badawczej to standard w tego typu wyzwaniach naukowych, ale fakt ich prawidłowego prowadzenia świadczy o opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę.

WNIOSEK KOŃCOWY

Rozprawa doktorska Pani **mgr Iwony AŁTYN**, zatytułowana „*Analiza substancji niepożądanych – wtórnych metabolitów grzybów pleśniowych w surowcach roślinnych oraz otrzymanych z nich suplementów diety*”, przygotowana pod kierunkiem Pani Promotor dr hab. Magdaleny Twarużek, prof. uczelni (UKW) **spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r poz. 1668 z późn. zm.)**, ponieważ stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego; potwierdza wiedzę teoretyczną kandydatki w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze i **w dyscyplinie nauki biologiczne**, potwierdza umiejętność wyznaczenia celu badań i samodzielnego rozwiązywania problemu na wszystkich etapach pracy badawczej oraz wnosi istotny, innowacyjny wkład w zakresie poznania zagrożeń związanych z zanieczyszczeniem mykotoksynami roślinnych suplementów diety.

Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Iwony Ałtyn i dopuszczenie Doktorantki do dalszych procedur związanych z nadaniem stopnia doktora w **dyscyplinie nauki biologiczne**.

Szczecin, 5.01.2023 r.

Katedra Hydrobiologii, Ichtiologii
i Biotechnologii Rozrodu


Prof. dr hab. Kinga Mazurkiewicz-Zupałowicz