

Ocena

pracy doktorskiej mgr Justyny Walczak pt. *„Lipidomika – separacja i identyfikacja frakcji biologicznie aktywnej z wykorzystaniem sprzężonych technik separacyjnych”*

Celem pracy doktorskiej Pani mgr Justyny Walczak było opracowanie nowych metod izolowania i analizowania fosfolipidów naturalnych z żółtek jaj kurzych i przepiórczych oraz z mleka krowiego. Tak postawiony cel badań uznaję za uzasadniony tak ze względów poznawczych jak i wybranych produktów i surowców żywieniowych. Pracując od lat w tematyce fosfolipidów, zdaję sobie sprawę, że znane i stosowane dotąd metody analizy fosfolipidów można poprawić tak pod względem dokładności jak i wiarygodności pomiaru. Szczególnie, gdy zabiera się do tego Zespół analityków Prof. Buszewskiego, jeden z czołowych zespołów nie tylko w Polsce, ale i na świecie. Również materiał badawczy jest w pełni uzasadniony, gdyż zarówno jaja kurze jak i mleko są podstawowymi produktami spożywczymi diety człowieka. Są to również produkty, które są prozdrowotne i niezbędne dla właściwego funkcjonowania naszego organizmu.

Przesłana do recenzji mi dysertacja składa się z wprowadzenia, pięciu publikacji naukowych, manuskryptu jednej publikacji oraz podsumowania i wniosków. W części wstępnej Autorka objaśnia co to jest lipidomika, tzn. jaki obszar badawczy obejmuje i co jest jej przedmiotem badań. Badania dotyczące lipidów to pogranicze chemii i biologii. Przedmiotem badań są natomiast tkanki i komórki organizmów żywych, a ich celem jest ustalenie składu lipidowego w badanym obiekcie, czyli lipidomiu. Uzyskane dane w połączeniu z innymi omik: genomiki, proteomiki i metabolomiki pozwalają ustalić skład lipidomów w zależności od genów, a także dokładniej poznać funkcje lipidów w fizjologii organizmów żywych oraz procesy ich metabolizmu. Informacje uzyskane z tych badań mogą być użyteczne przy diagnozowaniu różnych chorób, np. miażdżycy czy też choroby Alzheimera.

Na kolejnych stronach Autorka omawia cechy lipidów i ich podział na poszczególne, strukturalne, klasy. Bardziej szczegółowo omawia obiekty swoich badań, fosfolipidy. Podkreśla ich prozdrowotne działanie w procesach fizjologicznych człowieka. Prezentuje również kwasy tłuszczowe omawiając różnice w ich budowie. Podkreślając fakt, że kwasy

ω -3 i ω -6 nie są syntezowane w organizmie człowieka, podaje źródła ich dostępności w poszczególnych produktach żywnościowych jak ryby, orzechy, olej lniany i jaja kurze. Podkreśliła znaczenie kwasów ω -3, szczególnie dokozaheksanowego w rozwoju mózgu u dzieci.

W następnym rozdziale części wprowadzającej, Doktorantka przedstawia metodologię badawczą przy analizie lipidów w danej próbce. Omawia więc kolejno, metody izolowania lipidów z materiału biologicznego, metody ich rozdzielenia oraz identyfikacji i metody opracowywania uzyskanych danych analitycznych.

W kolejnej części dysertacji prezentuje 5 prac naukowych już opublikowanych i manuskrypt wysłanej do druku stanowiących Jej osiągnięcie, kwalifikujące do uzyskania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Wszystkie prace są współautorskie. W pięciu z nich jest pierwszym autorem. Na zakończenie dysertacji dołączone są oświadczenia współautorów wskazujące, że mgr Justyna Walczak jest wiodącym współautorem, a już na pewno głównym wykonawcą części eksperymentalnej prac. Dwie z tych prac, D1 i D5, mają charakter prac przeglądowych. Pozostałe cztery są oryginalnymi pracami doświadczalnymi.

W pierwszej z prac przeglądowych (D1) Autorka przekonuje czytelnika do istotności analizy żywności oraz wskazuje na skomplikowany charakter analizy surowców i produktów żywnościowych. W pracy zamieszczone są schematy ideowe takiej analizy i przykłady oznaczania składników żywności – fosfolipidów.

W kolejnej publikacji przeglądowej (D5) mgr Walczak omawia analizę prawie wszystkich głównych składników jaja kurzego, a więc zarówno białka jak i żółtka. Prezentowane są więc metody analizy peptydów i białek oraz metody analizy lipidów ze szczególnym uwzględnieniem fosfolipidów. W pracy omówiona jest również rola poszczególnych składników białka i żółtka na fizjologię człowieka i ich prozdrowotne właściwości. Podkreślone jest także zastosowanie tych składników w technologii wytwarzania żywności oraz do kontroli mikrobiologicznej tych procesów. Jest to więc artykuł, który razem z artykułem D1 tworzyłby w klasycznej formie pracy doktorskiej część literaturową.

W pracy D2, już doświadczalnej, Autorka prezentuje wyniki analizy fosfolipidów izolowanych z żółtek jaj kurzych wzbogaconych w nienasycone kwasy tłuszczowe ω -3 i ω -6 od niosek karmionych paszą wzbogaconą w te właśnie kwasy. Analizy frakcji lipidowej dokonała stosując dwuwymiarową wysokosprawną chromatografię cieczową z detektorem ESI-MS/MS. W pierwszym wymiarze stosowała preparatywną kolumnę C18, a w drugim poszczególne uzyskane frakcje rozdzielała za pomocą kolumny wypełnionej żelom

krzemionkowym modyfikowanym *N,O*-dialkilofosforoamidem. Stosując tak zmodyfikowaną kolumnę analityczną, zidentyfikowała w badanej frakcji fosfolipidowej: fosfatydylocholinę, fosfatydyloetanoloaminę, sfingomielinę, lizofosfatydylocholinę, lizofosfatydyloetanoloaminę, lizofosfatydyloglicerol oraz glicerofosfocholinę. Głównymi składnikami tej mieszaniny były fosfatydylocholina (73%), fosfatydyloetanoloamina (15,5%). Spośród 15 zidentyfikowanych fosfatydylocholin, aż 7 zawierało w swojej strukturze kwasy ω -3, głównie linolenowy i dokozaheksaenowy, a dwie zawierały zarówno kwasy ω -3 jak i ω -6. Identyfikacji tych kwasów dokonała na podstawie widm masowych fosfatydylocholin.

Kolejnymi produktami badawczymi były mleko surowe oraz sproszkowane. Autorka w pracy D3 prezentuje nową metodę analizy fosfolipidów z mleka surowego i sproszkowanego za pomocą chromatografii cieczowej wykorzystującej oddziaływania hydrofilowe z zastosowaniem kolumny z wypełnieniem fosfodiestrowym i detektorem UV (206 nm). Analiza ilościowa była przeprowadzona z zastosowaniem metody laserowej jonizacji z udziałem matrycy i pomiaru czasu przelotu (MALDI-TOF MS). Poszczególne fosfolipidy były identyfikowane na podstawie danych z widm spektrometrii mas. Analiza wykazała obecność 14 fosfatydylocholin w surowym mleku oraz 9 w mleku sproszkowanym, a także 4 lizofosfatydylocholin w mleku surowym i 3 w mleku sproszkowanym. Ponadto zidentyfikowano w mleku surowym i sproszkowanym odpowiednio 4 i 3 fosfatydyloetanoloaminy, 4 i 2 sfingomieliny, 3 i 1 fosfatydyloserynę oraz 4 i 3 fosfatydyloinozytole. Analiza kwasów nienasyconych w mleku surowym i sproszkowanym wskazuje, że w tym pierwszym obecne są kwasy nienasycone z grupy ω -3 (głównie dokozaheksaenowy) i kwas arachidonowy (ω -6), których brak w mleku sproszkowanym. Autorka wyprowadza z tej obserwacji wniosek, że różnica ta wynika z technologii produkcji mleka sproszkowanego. Trudno się z tym wnioskiem nie zgodzić.

W trzeciej opublikowanej pracy doświadczalnej (D4) treścią są wyniki badań nad opracowaniem nowej metody analizy kwasów tłuszczowych występujących w fosfolipidach w żółtku jaja przepiórki. Analizie poddano żółtka jaj od niosek karmionych standardową paszą oraz niosek suplementowanych selenem z drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*, suszonymi algami i olejami rybnymi. Fosfatydylocholinę i fosfatydyloetanoloaminę rozdzielano stosując chromatografię cieczową z zastosowaniem złoża alkiloamidowego zapewniającego hydrofilowe oddziaływania z nim rozdzielanych substancji. Detektorem w tej metodzie były dwa sprzężone spektrometry mas, a jony uzyskano w wyniku elektrorozpylania (ESI). Zidentyfikowano tą metodą 15 fosfatydylocholin i 8 fosfatydyloetanoloamin. Analiza wykazała obecność 10 fosfatydylocholin w żółtkach jaj przepiórek karmionych standardowo

i 11 fosfatydylocholin w żółtkach niosek suplementowanych. Skład kwasów tłuszczowych w analizowanych fosfolipidach został ustalony na podstawie wyników analizy GC-MS estrów metylowych tych kwasów. Analiza wykazała zwiększoną obecność kwasów ω -3 (DHA i EPA) w żółtkach jaj niosek suplementowanych. Wynik ten uzasadnia pomysł, że dodawanie do karmy przepiórek składników bogatych w polinienasycone kwasy tłuszczowe może być dobrym sposobem na wzbogacanie jaj tych ptaków w składniki o dużej wartości prozdrowotnej.

W ostatniej pracy, a w zasadzie jej manuskrypcie przedstawiona jest nowa, szybka metoda identyfikacji różnych kombinacji kwasów tłuszczowych zawartych w fosfolipidach żółtek jaj kurzych. Doktorantka analizowała żółtka jaj od trzech rodzajów niosek: karmionych paszą standardową, wzbogaconą oraz hodowanych na wolnym wybiegu. Analizę fosfolipidów prowadziła w układzie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemowym układem detektorów MS/MS. Jonizację prowadzono metodą elektrorozpylania. Tą metodą zidentyfikowała 124 fosfolipidy, w tym w zdecydowanej przewadze, fosfatydylocholiny (30,65%) oraz fosfatydyloetanolaminy (19,35%), oraz ich lizopochodne. Liczba poszczególnych fosfatydylocholin to liczba kombinacji kwasów tłuszczowych. Analizując zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w poszczególnych rodzajach żółtka, potwierdziła się zasada, że suplementacja niosek tymi kwasami jest skuteczną metodą wzbogacania w nie żółtek jaj kurzych. Ta ostatnia metoda analizy fosfolipidów jest doskonałym sposobem na szybką identyfikację fosfolipidów w surowcach czy produktach spożywczych.

Przed przystąpieniem do oceny wartości naukowej uzyskanych przez mgr Justynę Walczak wyników trzeba podkreślić, że zostały one już w dużej części opublikowane w renomowanych czasopismach (*Journal of Chromatography A*, *Food Analytical Methods*, *Critical Review in Analytical Chemistry* oraz *Health Problems of Civilization*). Łączny impact factor prac opublikowanych wynosi 10,963. Wyniki te były więc już oceniane zarówno pod względem wartości merytorycznej jak i ich opracowania. W pełni podzielam opinię recenzentów tych prac. W mojej ocenie wyniki uzyskane przez mgr Walczak mają dużą wartość naukową i to zarówno w aspekcie poznawczym jak i ich aplikacyjności.

Doktorantka opracowała nowe metody analizy fosfolipidów izolowanych z żółtka jaja kurzego, z jaj przepiórczych oraz z mleka krowiego, surowego i sproszkowanego. Do rozdziału poszczególnych fosfolipidów stosowała nowe fazy stacjonarne: *N,O*-dialkilofosforoamidową (analiza fosfolipidów żółtka jaja kurzego), fosfodiestrową (w analizie fosfolipidów mleka) i alkiloamidową (w analizie fosfolipidów żółtka jaj przepiórczych).

Mgr J. Walczak analizowała również kwasy tłuszczowe zawarte w tych fosfolipidach. Stosowała w tym celu bądź chromatografię gazową sprzężoną z detektorem MS jeżeli przeprowadzała te kwasy w estry metylowe, bądź wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemowym układem detektorów MS. Opracowane metody są nowatorskie tak pod względem stosowanych faz stacjonarnych jak i układu detektorów masowych. W tym miejscu chciałbym podkreślić bardzo dobrą interpretację widm masowych zaprezentowaną przez Doktorantkę. Opracowane metody analizy mogą znaleźć zastosowanie do określania zawartości jakościowej i ilościowej fosfolipidów w surowcach do produkcji żywności oraz w wytworzonych produktach. Mogą być także stosowane do badań jakości i autentyczności produkowanej żywności.

Bardzo dobrze również oceniam opracowanie uzyskanych wyników w dysertacji doktorskiej. Opracowanie części wstępnej i podsumowanie jest adekwatne do tytułu i treści zawartej w publikacjach przedstawionych jako osiągnięcie naukowe. Bardzo rzadko zdarzało mi się recenzować prace doktorskie z tak niewielką liczbą błędów. Jeden ze znalezionych błędów w tej pracy przydarzył się autorom publikacji D2. Źle jest narysowany wzór *N,O*-dialkilofosforoamidu. Zgodnie ze wzorem jest to raczej *N*-alkilo-aminofosfonian oktadecylu.

Podsumowując moją ocenę wartości naukowej uzyskanych wyników oraz ich opracowanie w dysertacji doktorskiej stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Justyny Walczak spełnia z naddatkiem wymogi stawiane przez Ustawę o stopniach i tytule naukowym tego typu opracowaniom. Proszę więc Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu na niezwykle dużą wartość naukową uzyskanych przez Doktorantkę wyników i dorobek naukowy mgr Justyny Walczak: 10 opublikowanych prac oraz 18 komunikatów konferencyjnych, proponuję wyróżnić pracę doktorską i jej Autorkę stosowną nagrodą.

