



**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Szymanowskiej**  
**p.t.: „Wpływ wybranych procesów technologicznych na aktywność biologiczną**  
**związków fenolowych owoców malin *Rubus idaeus* L. odmiany Polana”**  
**przeprowadzona dla Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu**  
**Przyrodniczego w Lublinie.**

Problematyka recenzowanej pracy wpisuje się w nurt badań dotyczących poszukiwania i efektywnego pozyskiwania naturalnych substancji leczniczych.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 207 stron wraz z zawartymi w tekście rysunkami i tabelami oraz Anekssem. Na zasadniczą część pracy składa się Wstęp (2 str.), Przegląd Literatury (44 str.), Cel pracy (2), Materiał i metody (14), Omówienie wyników (70), Dyskusja wyników (20), Wnioski (2) i Bibliografia (26). Rozprawę poprzedza spis stron, wykaz używanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

We *Wstępie* Autorka krótko zarysowała kontekst badanej problematyki podkreślając korzyści zdrowotne owoców jagodowych ze wskazaniem na maliny jako źródło związków polifenolowych o oczekiwanym działaniu leczniczym.

Rozdział *Przegląd literatury* zawierający bezpośrednią teoretyczną podstawę do badań własnych Doktorantki ujmuje wiadomości z zakresu fitochemii owoców jagodowych w tym malin, charakteryzuje soki, sposoby otrzymywania soków oraz wpływ preparatów enzymatycznych na wydajność produkcji. Opisuje owoce jako źródło związków fenolowych. Charakteryzuje flawonoidy, kwasy fenolowe, antocyjany i związki garbnikowe najczęściej spotykane w owocach i warzywach. Cytuje doniesienia na temat wpływu różnorodnych czynników mogących mieć wpływ na poziom i skład omawianych grup związków w surowych owocach i pochodzących z nich produktach spożywczych. W kolejnych podrozdziałach opisuje właściwości biologiczne związków roślinnych fenolowych skupiając uwagę na właściwościach przeciwutleniających, przeciwzapalnych, oraz o działaniu chemoprewencyjnym i antykancerogennym. W ostatniej części *Przeglądu*

*literatury* Autorka charakteryzuje lipooksygenazę i cyklooksygenazę, podając ich budowę chemiczną i funkcje oraz cytuje prace donoszące o roślinnych inhibitorach tych enzymów.

Kolejnym rozdziałem jest *Cel pracy*, w którym Doktorantka na początku sformułowała hipotezę badawczą. Założyła, że procesy technologiczne stosowane w przetwórstwie malin modyfikują aktywność biologiczną surowca. Do zweryfikowania tej hipotezy wyznaczyła cel badań, którym było określenie wpływu preparatów enzymatycznych stosowanych w procesie maceracji owoców z malin na zawartość i aktywność biologiczną obecnych w malinach polifenoli. W przedstawionej strategii realizacji celu zaproponowała dodatkowo badania zależności tych wielkości od czasu przechowywania soków.

W rozdziale *Materiał i metody* zaprezentowała postępowanie badawcze, przedstawiła materiał roślinny do badań: systematykę i cechy morfologiczne *Rubus idaeus* L. odmiany Polana, uzyskany z Ekologicznego Gospodarstwa Ogrodniczego w Tarnogrodzie. Do rozwiązania problemu badawczego Doktorantka użyła miazgę malinową, soki, wytloki i wytloki depektynizowane przygotowane bez udziału i z udziałem preparatów enzymatycznych Pectmex Ultra SP-L, Pectimex Yield Mash i Ultraenzym AFP-L. W każdym z tych bazowych produktów oznaczyła zawartość związków fenolowych ogółem, kwasów fenolowych, flawonoidów i antocyjanów wykorzystując znane i odpowiednie metody spektrofotometryczne oraz określiła właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Przygotowała także syropy z 30% i 70% zawartością sacharozy, w których oznaczyła zawartość tych samych grup metabolitów wtórnych oraz określiła właściwości zmiatania wolnych rodników DPPH i ABTS oraz zdolność chelatowania jonów żelaza.

Kolejnym etapem badań było wyodrębnienie z poszczególnych produktów bazowych 2 frakcji polifenolowych: jednej zawierającej m.in. kwasy fenolowe i flawonoidy oraz frakcji antocyjanowej. W tym celu Autorka zastosowała technikę ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z kolumnkami C18 wykorzystując jako eluenty octan etylu i zakwaszony metanol. Otrzymane frakcje Doktorantka poddała analizie przy użyciu chromatografu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami RP HPLC wyposażonego w detektor DAD. W doświadczeniu stosowała kolumnę Varian ChromSpher i elucję gradientową mieszaniną 4,5% kwasu octowego i 50% acetonitrylu w przypadku flawonoidów i kwasów fenolowych oraz mieszaniną 4,5% kw. mrówkowego i acetonitrylu z udziałem 2% kw. mrówkowego w przypadku antocyjanów. Identyfikacji związków dokonała na podstawie porównania czasów retencji i widm w UV z

odpowiednimi wzorcami. W kolejnych etapach Doktorantka określała zdolność frakcji antocyjanowych i frakcji pozostałych związków fenolowych do neutralizowania wolnych rodników DPPH i ABTS, zdolność do chelatowania jonów żelaza oraz zdolność redukcji żelaza (III) do żelaza (II). Właściwości przeciwzapalne określała przez określenie zdolności hamowania aktywności lipooksygenazy i cyklooksygenazy metodami spektrofotometrycznymi. Wyznaczyła stałą Michaelisa-Menten określając powinowactwo enzymu do substratu dla LOX i COX. Oprócz badań aktywności przeciwzapalnych i przeciwutleniających Doktorantka z pomocą testu z błękitem trypanu badała działanie ekstraktów i frakcji na żywotność komórek białaczkowych. Badania prowadziła na liniach HL-60 (ostrej białaczki promielicytowej) oraz Jurkat E6-1 (ostrej białaczki limfoblastycznej). Analizy statystycznej wyników dokonała na bazie programu STATISTICA 7.0

Najobszerniejszy rozdział *Omówienie wyników* Autorka pracy podzieliła na następujące rozdziały: 1. Charakterystyka miazgi malinowej poddanej maceracji. 2. Uzysk soku z miazgi malinowej poddanej obróbce enzymatycznej. 3. Wpływ przechowywania soków i syropów na zawartość związków fenolowych i ich aktywność przeciwutleniającą. 4. Charakterystyka wytlóków uzyskanych w procesie otrzymywania soku z malin. 5. Charakterystyka wytlóków poddanych depektynizacji. Uzyskane dane zaprezentowała na 42 rycinach i w 35 tabelach.

W *Dyskusji wyników* Autorka pracy porównuje swoje wyniki z wynikami z piśmiennictwa na ten temat.

Wyniki recenzowanej pracy wnoszą wiele cennych informacji.

Po pierwsze wykazują, że owoce maliny są cennym źródłem składników o właściwościach przeciwutleniających powodujących zmiatanie wolnych rodników, chelatowanie żelaza i redukujących jony żelaza. Zawierają inhibitory lipooksygenazy i cyklooksygenazy przez co wpływają na właściwości przeciwutleniające malin. Potwierdza to stosowanie malin i wykonanych z nich przetworów w stanach zapalnych. Ponadto zawierają składniki cytotoksyczne wobec komórek ludzkich linii białaczkowych.

Po drugie wskazują, że to związki polifenolowe takie jak antocyjany, flawonoidy i kwasy fenolowe zawarte w malinach i przetworach mają znaczący udział w badanych aktywnościach biologicznych. Badania poszerzają wiedzę na temat zawartości i składu związków polifenolowych

Po trzecie dowodzą, że stosowanie w procesie tłoczenia soku z malin preparatów enzymatycznych wpływa dodatnio na uzysk soku oraz w różnym stopniu na zawartość oraz aktywność biologiczną soku i obecnych w nim związków polifenolowych, a przetrzymywanie soków i syropów zmniejsza zawartość badanych polifenoli.

W trakcie czytania tej rozprawy nasuwają mi się następujące pytania:

W prezentowaniu systematyki roślin w pracach naukowych oczekiwane jest stosowanie nazw łacińskich. W oparciu o jaką pozycję piśmiennictwa została przedstawiona systematyka *Rubus idaeus* L.? W *Dyskusji* Autorka podaje, że w trakcie oczyszczania frakcji fenolowych na SPE mogły wystąpić straty. Czy była wykonana optymalizacja ilości eluentu użytego do wymycia kolumny SPE? Na jakiej podstawie niektóre piki na chromatografach HPLC zostały zaliczone do pochodnych katechiny i epikatechiny?

W *Materialach i metodach* jest podane, że do wyznaczenia stałej  $K_m$  stosowano 5 rozcieńczeń substratu, zaś w odpowiadających punktach *Omówienia wyników* -3 rozcieńczenia. Które dane są prawdziwe?

Z obowiązku recenzenta odnotowuję także uwagi krytyczne.

W pracy część nazwisk cytowanych autorów nie została odmieniona. Kwas cyjanonowy został zaliczony do kwasów fenolowych. Przy oznaczaniu ilości flawonoidów, kwasów fenolowych itd. bardziej odpowiednie od określenia „stężenie” byłaby „zawartość” w .. (str. 69). Roztwór B do elucji antocyjanów metodą HPLC to acetonitryl z dodatkiem kwasu a nie r-r kwasu (str. 71). Niewłaściwie przedstawiony zapis stosowanej w HPLC elucji gradientowej może być zrozumiany, że proces rozdziału chromatograficznego trwał ponad 8 godzin (str.71). Doktorantka nie ustrzegła się powtórzeń, które niepotrzebnie zwiększyły objętość tekstu. Dla przykładu podam, że objaśnienie pochodzenia linii komórek białaczkowych ze str. 83 zostało powtórzone jeszcze na str. 90,100 i 112. Błędna jest interpretacja na str. 137, z której wynika, że zdolność wyłoków do neutralizacji rodnika jest najmniejsza bo wartość  $IC_{50}$  jest najmniejsza i największa bo wartość  $IC_{50}$  jest największa. W danych umieszczonych na stronach 151 i 154 dotyczących zawartości kwasów fenolowych zamiast mikro- są miligramy. Umieszczone w tabeli 25 wartości współczynników  $IC_{90}$  były powyżej, a nie poniżej wartości 1,5 i 1,875 mg. Na str. 142 zamiast tabela 26 powinno być tabela 40. Najwięcej usterek dotyczy *Piśmiennictwa* obejmującego 312 nienumerowanych pozycji ułożonych alfabetycznie. Poza błędami literowymi i znakami interpunkcji są w kilkunastu przypadkach rozbieżności co do roku wydania publikacji cytowanej w tekście i w *Piśmiennictwie* oraz braki w wykazie literatury

niektórych cytowanych pozycji: Robins 2003, Baraniak-Szymanowska 2006, Maiga i wsp. 2006, Souza i wsp. 2013.

Na podkreślenie zasługują mocne strony ocenianej rozprawy doktorskiej, do których zaliczam:

Kompleksowe, wielokierunkowe badania miazgi malinowej i uzyskanych z niej soków, syropów i oddzielonych z nich ekstraktów i frakcji oraz wycieków, pozwalające na właściwą ocenę wartości produktów z malin w zależności od sposobu ich pozyskiwania.

Wykonanie 4 metod do określenia właściwości antyoksydacyjnych co pozwoliło na zbadanie różnych mechanizmów oddziaływania przeciwutleniającego: właściwości zmiatania wolnych rodników, zdolności wiązania jonów żelaza, które katalizują powstawanie reaktywnych form tlenu oraz zdolności redukcji żelaza (II) do (III), czyli zdolności do oddawania wolnego elektronu co także jest wyznacznikiem właściwości przeciwutleniających.

Wnikliwą i wyczerpującą dyskusję wyników.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Urszuli Szymanowskiej p.t.: "Wpływ wybranych procesów technologicznych na aktywność biologiczną związków fenolowych z owoców *Rubus idaeus* L. odmiany Polana" stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na dobre opanowanie przez Doktorantkę zagadnień teoretycznych pochodzących z zakresu objętego przedmiotem dysertacji. Doktorantka zaprojektowała i w pełni zrealizowała przyjęty na wstępie plan badań, a uzyskane wyniki mają duże znaczenie poznawcze i praktyczne.

Recenzowana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i z pełnym przekonaniem przekładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Urszuli Szymanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin. 08.09.2014

Prof. dr hab.  
Helena Danuta Smolarz

