

Wrocław, 26.08.2014 r.

Prof. dr hab. Jan Oszmiański
Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

R E C E N Z J A rozprawy doktorskiej

Recenzja przedłożonej rozprawy doktorskiej mgr inż. Urszuli Szymanowskiej pt.

„**Wpływ wybranych procesów technologicznych na aktywność biologiczną związków fenolowych owoców malin *Rubus idaeus* L. odmiany Polana**”, wykonanej w wykonana w Katedrze Biochemii i Chemii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie składa się z oceny następujących elementów:

1. Dobór i znaczenie tematu.
2. Bibliografia i znajomość literatury.
3. Układ pracy i wymogi formalne.
4. Zastosowana metodyka badań.
5. Koncepcja rozwiązania problemu naukowego i przedstawionych wyników.
6. Prawidłowość wnioskowania.
7. Ocena końcowa.

Ad. 1. Ocena doboru i znaczenia tematu

W Polsce zbiera się ponad 120 tys. ton malin, co daje czołowe miejsce w rankingu światowym. Owoce te są cenione i chętnie spożywane w postaci świeżej i przetworzonej z powodu atrakcyjnych cech smakowych. Są one szczególnie zasobne w związki bioaktywne o wysokiej wartości żywieniowej i prozdrowotnej. Stanowią dobre źródło cennych dla organizmu ludzkiego polifenoli, zwłaszcza antocyjanów i elagotanin, błonnika oraz substancji mineralnych. Maliny są dobrym surowcem dla przetwórstwa na soki, syropy, dżemy, mrożonki i inne produkty. W spożywaniu malin w całości w postaci świeżej i w dżemach przeszkadza obecność w nich drobnych pestek. Natomiast są one usuwane w procesie produkcji soków, który stanowi ważny kierunek przetwórstwa tych owoców. Mało poznane są skutki procesu produkcji soku, zwłaszcza obróbki enzymatycznej na zawartość związków bioaktywnych. Dlatego podjęcie tematu dotyczącego oceny potencjału prozdrowotnego malin, otrzymanych z nich soków, jak również możliwość wykorzystania wytlóków jako źródła związków bioaktywnych przez mgr inż. Urszulę Szymanowską jest w pełni

uzasadnione i celowe. Powszechnie znane są w medycynie ludowej właściwości profilaktyczne i lecznicze malin oraz otrzymanych z nich produktów.

Autorka w rozprawie doktorskiej podjęła się trudnego zadania kompleksowej oceny surowca, warunków procesu technologicznego otrzymywania soków z malin oraz pozostających po tłoczeniu wyłoków pod względem zawartości i aktywności biologicznej związków polifenolowych.

Z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury analitycznej jak chromatografia cieczowa i metod spektrofotometrycznych, oceniała zawartość związków polifenolowych i zdolność inhibitowania aktywności lipooksygenazy i cyklooksygenazy-2 oraz właściwości przeciwnowotworowych *in vitro* związków fenolowych oraz oczyszczonych frakcji fenolowych i antocyjanowych z malin, soku i wyłoków.

Praca ma dużą wartość poznawczą i praktyczną w zakresie przetwórstwa i wartości prozdrowotnych malin. Doktorantka podjęła się trudnego, ważnego dla nauki, interesującego tematu badań.

Ad. 2. Ocena bibliografii i znajomości literatury

Bibliografia pracy jest bardzo bogata, liczy 312 publikacji związanych z tematem badań. Zdecydowana większość pozycji literaturowych jest z ostatniego dziesięciolecia. Duża część cytowanych prac jest opublikowana w języku angielskim. Świadczy to o dużej dociekliwości i pracowitości w gromadzeniu informacji na badany temat ze światowej literatury. Recenzent nie ma zastrzeżeń odnośnie znajomości tematu, zakresu i sposobu wykorzystania przedstawionej literatury.

Ad. 3. Ocena układu pracy i wymogów formalnych

Praca, przedłożona do recenzji w formie maszynopisu jest bardzo obszerna zawiera w 207 stron tekstu łącznie z wykazem literatury. Konstrukcja pracy jest zgodna z wymogami pisania rozpraw i oparta na podziale rzeczowym. Składa się z wprowadzenia literaturowego, celu pracy, rozdziałów części doświadczalnej obejmujących opis materiału i organizacji doświadczeń oraz metod analitycznych, przedstawienia wyników i osobno dyskusji oraz wniosków i streszczenia w języku polskim i angielskim. Wyniki badań zamieszczone są na 49 dobrze przygotowanych rysunkach i w 39 tabelach.

W obszernym przeglądzie literatury na 44 stronach przedstawione są informacje o żywności pochodzenia roślinnego jako źródle związków bioaktywnych, duża część tego podrozdziału dotyczy owoców jagodowych w tym malin. Zagadnienia te są ściśle tematycznie związane z przedmiotem rozprawy. Kolejny rozdział dotyczy produkcji soków owocowych i obróbki enzymatycznej stosowanej w ich otrzymywaniu. Ostatnia część najbardziej obszerna przeglądu literatury poświęcona jest związkom fenolowym w owocach. Autorka przedstawiła budowę tych związków, podział i aktywności biologiczne, ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień poświęconym właściwościom przeciwutleniającym, przeciwzapalnym hamującym enzymy lipooksygenazę i cyklooksygenazę-2 oraz przeciwnowotworowym. Wszystkie te informacje są ściśle związane z przedmiotem Jej badań. Autorka wykazała się dobrą znajomością zagadnień, którym poświęcona jest rozprawa doktorska. Obszerne opracowanie literaturowe mgr inż. Urszula Szymanowska może opublikować w formie pracy przeglądowej.

W tej części rozprawy są drobne błędy. Autorka używa potocznego języka jak „owoce kolorowe”, „antyoksydanty” zamiast polskiego słowa „przeciwutleniacze”. Niepoprawne są nazwy związków polifenolowych „cyjanidyno-3-galaktozyd i cyjanidyno-3-arabinozyd” zamiast „cyjanidyno-3-O-galaktozyd i cyjanidyno-3-O-arabinozyd” (strona 23) „myricetyny” zamiast „mirycetyny” (strona 33, 62), „cyanidyny” zamiast „cyjanidyny” (strona 34), „flawon-3-oli” zamiast „flawan-3-oli” (strona 38). Są błędy w pisowni i literowe jak dwukrotnie w zdaniu słowo „hydrolizy” (strona 23), „przy temperaturze” zamiast „w temperaturze” (strona 24), „znajdujących się ” zamiast „znajdujących się ” (strona 29), „różnych” zamiast „różnych” (strona 52), „Różnice” zamiast „Różnice” (strona 56). Błędnie stawiane są kropki po tytułach rysunków (rys. 1, 3-10) i tabel (tabela 3, 5, 6).

Do tej części pracy nie mam żadnych innych zastrzeżeń, z wyjątkiem że jest zbyt obszerny.

Cel pracy został przedstawiony poprawnie, można byłoby skrócić go, na przykład podając łącznie punkty 1 i 2.

W części doświadczalnej pracy na 14 stronach zaprezentowany jest opis materiału badawczego, przebiegu badań oraz dokładne opisy wykonania doświadczeń i zastosowanych metod analitycznych. Tę część można byłoby skrócić zamieszczając opis malin i ich systematykę w części literaturowej. Rozdział ten napisany jest czytelnie, Autorka nie ustrzegła się jednak błędów. Brak jest informacji o miejscu realizacji badań. Powinna być ściślej podana temperatura przechowywania a nie tylko, że „Otrzymane syropy przechowywano w temperaturze pokojowej” (strona 67). Niepoprawnie używane jest słowo

„próby” zamiast „próbki” (strona 69, 73), zamiast „ekwilibrowana” po polsku jest poprawnie „równowazona”,

W opisie metod chromatograficznych HPLC brak jest informacji o długości fali przy której rejestrowano chromatogramy (strona 71). Błędna jest informacja „15 ml zakwaszonego 90% etanolu (0,1% v/v metanolewy roztwór HCl)” (strona 76). Czy to był etanol, czy metanol użyty do ekstrakcji? Nie zaczyna się zdania od skrótu „Ok. 10% komórek ..” (strona 76).

Rozdział „V. Omówienie wyników” jest przedstawiony osobno bez dyskusji na 70 stronach, podzielony w logiczny sposób na podrozdziały zgodnie z kolejnością przeprowadzonych doświadczeń. Dotyczy on kolejno osobno badań nad miazgą malinową poddaną enzymatycznej maceracji, następnie sokom i wyciągiem uzyskanym w procesie otrzymywania soków z malin. Szkoda, że Autorka nie przedstawiła porównania wybranych wyników równocześnie dla trzech rodzajów produktów dla pokazania bilansu związków polifenolowych i aktywności biologicznej.

Wyniki badań są bogato ilustrowane dobrze przygotowanymi rysunkami, tabelami oraz uzupełnione obliczeniami statystycznymi.

Do tego rozdziału mam drobne uwagi dotyczące nazewnictwa „flawanole i procyjanidyny” (strona 84), procyjanidyny to też flawanole powinno być „flawanole w tym procyjanidyny”, poprawnie należy pisać „(-)epikatechina” a nie „epikatechina” (tabela 9, 18, 33 i 39) i na stronie 139. W jaki sposób i jakie zidentyfikowano osobno pochodne (+) katechiny (suma) i (-) epikatechiny (suma) (tabela 9, 18, 33 i 39)? Błąd literowy „antocyjanowe” (strona 94), „maizgi malinowej traktownej” (strona 108) „Dla pozostałych próbek aktywność ta była zbliżona i wyniosła” (strona 145). Styl: „Aktywność cyklooksygenazy-2 najsilniej hamowały wyciągi kontrolne (IC₅₀=0,2 mg śm/ml), najsłabiej natomiast wyciągi poddane działaniu preparatu Ultrazym AFP-L (WE3) (IC₅₀=0,18mg śm/ml) – rysunek 46b.” (strona 139)

Dyskusję wyników zamieszczono osobno w rozdziale VI na 28 stronach. Została ona poprawnie przeprowadzona na podstawie bogatej bibliografii i zakończona podsumowaniem. W tej części pracy mam pytanie co to jest za związek procyjanidyna G? „procyjanidyn B1-B8 i G” (strona 160). W końcowej części rozprawy doktorskiej mgr inż. Urszula Szymanowska przedstawiła czternaście wniosków dotyczących najważniejszych wyników. Błędnie pisane są nazwy związków „katechina i epikatechina” zamiast „(+)-katechina i (-)katechina oraz zamiast „flawonoidów i antocyjanów” powinno być „flawonoidów w tym antocyjanów”. W dalszym rozdziale w bibliografii spis pozycji literaturowych nie jest przedstawiony

jednorodnie. Autorka zamieszcza pełne nazwy czasopism i skróty przykładowo: pozycja 21 „Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny”, pozycja 207 „Przemysł Fermentacyjny i Owocowo- Warzywny” i pozycja 309 „Przem. Ferm. i Owoc.-Warzyw”. Pomocny w czytaniu pracy jest zamieszczony wykaz skrótów i oznaczeń. W aneksie w podpisie rysunków chromatogramów brak jest informacji o długości fali przy której były one rejestrowane.

Ad.4.Ocena zastosowanej metodyki badań

Autorka wykazała się dobrym opanowaniem trudnych, różnorodnych technik analitycznych. W badaniach stosowała nowoczesną metodę chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD). Ponadto wykorzystywała metody spektrofotometryczne w analizie polifenoli ogółem, flawonoidów, antocyjanów i aktywności przeciwutleniającej. Stosowała techniki adsorpcji na fazie stałej (SPE) do frakcjonowania związków polifenolowych. Wykonywała oznaczenia potencjalnych właściwości przeciwzapalnych poprzez badanie hamowania aktywności lipooksygenazy (LOX) i cyklooksygenazy-2 (COX-2) z własną modyfikacją metody. Wyznaczała stałą Michaelisa-Menten (K_m), V_{max} dla LOX i COX-2 oraz określała typ inhibicji. Ponadto oznaczała aktywności cytotoksyczne ekstraktów z malin i otrzymanych z nich produktów na komórki białaczki.

Stosując wielokrotne powtórzenia uzyskała wartościowe wyniki, które dobrze opracowała statystycznie. Zastosowane metody były złożone i czasochłonne, wymagały dużego nakładu pracy, pozwoliły w pełni zrealizować założony ambitny cel badań. Cennym wkładem pracy Autorki były badania nad wpływem ekstraktów malinowych na hamowanie enzymów LOX i COX-2 oraz na komórki białaczki. Duża ilość bardzo trudnych, czasochłonnych i pracochłonnych badań pozwoliła na zrealizowanie celu pracy. Godne podkreślenia są obliczenia statystyczne wyników badań i sposób prezentacji na wykresach.

Ad.5.Ocena koncepcji rozwiązania problemu naukowego i przedstawionych wyników

Badania mgr inż. Urszuli Szymanowskiej dotyczyły trudnego i ambitnego zadania kompleksowej oceny zawartości związków polifenolowych i ich aktywności biologicznej w malinach odmiany Polana i otrzymanych z nich produktów. Ocenie poddano owoce, soki i wyciąki pozostające po tłoczeniu. Badania dotyczyły także syropów uzyskanych z soków malinowych z różnymi dodatkami sacharozy, bezpośrednio po produkcji i po

przechowywaniu. Kompleksowe badania wymagały pracochłonnego przygotowania ekstraktów i frakcjonowania techniką SPE oraz różnorodnych oznaczeń. Szczególnie istotnym i trudnym zadaniem były badania hamowania aktywności enzymów lipooksygenazy i cyklooksygenazy-2 oraz komórek nowotworowych białaczki przez frakcje i ekstrakty związków polifenolowych.

Interesującym aspektem pracy mgr inż. Urszuli Szymanowskiej była ocena działania preparatów enzymatycznych Pectinexu Ultra SP-L, Pectinexu Yield Mash (ME2) i Ultrazymu AFP-L na zawartość i profil związków polifenolowych oraz aktywność biologiczną produktów z malin. Szkoda, że Autorka nie użyła preparatów specjalnie polecanych do owoców jagodowych zawierających antocyjany jak Pectinex Color i Pectinex Be. Według producentów te preparaty nie zawierają aktywności glikozydaz hydrolizujących połączenia glikozydowe antocyjanów a chroniąc te związki zapewniają lepszą barwę sokom po obróbce enzymatycznej.

Dużą wartość poznawczą ma ocena poszczególnych grup związków polifenolowych, po rozfrakcjonowaniu ich na antocyjany i inne polifenole, na hamowanie aktywności enzymów lipooksygenazy i cyklooksygenazy-2 oraz komórek nowotworowych białaczki. Mankamentem tych badań było nie uwzględnienie w analizach najważniejszej grupy polifenoli malin to jest elagotanin. Autorka była świadoma zawartości tych związków, na stronie 159 podaje, że „elagotaniny stanowią nawet 85% zespołu związków czynnych owoców maliny właściwej, natomiast antocyjany około 23%, pozostałe związki polifenolowe (flawonoidy, fenolokwasy, czy pochodne flawan-3-olu) jedynie około 2%”. Natomiast oznaczała (+)-katechinę i (-)epikatechinę oraz jak podaje (strona 159), „prawdopodobnie ich pochodne z grupy flawon-3-oli (tabele 9, 18, 33, 39)”. W pracy nie jest podane jakie to były związki i jak je zidentyfikowano.

Dużym osiągnięciem Autorki była kompleksowa ocena zawartości poszczególnych grup polifenoli malin wraz z ich frakcjami i ich aktywności przeciwutleniającej oznaczonej różnymi metodami oraz zdolności hamowania enzymów lipooksygenazy i cyklooksygenazy-2 wykazującymi właściwości prozapalne. Doktorantka stwierdziła, że maliny, sok z malin oraz wyciągi mają właściwości hamujące aktywność tych enzymów, w stopniu zależnym od stężenia związków fenolowych. Ważnym osiągnięciem także było wykazanie, że ekstrakty surowe hamowały żywotność komórek nowotworowych skuteczniej niż oczyszczone frakcje antocyjanowe czy fenolowe.

Efektorem badań mgr inż. Urszuli Szymanowskiej były wyniki wykazujące, że związki fenolowe z owoców malin odmiany Polana mają właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe.

Badania Jej znacznie wzbogaciły wiedzę o właściwościach prozdrowotnych malin i otrzymanych z nich produktów. Praca ma nie tylko duży aspekt poznawczy ale zwłaszcza bardzo cenny praktyczny. Autorka udowodniła, że owoce malin oraz uzyskane z nich soki i wyciągi, stanowią dobre źródło związków fenolowych, które mogą być wykorzystane w profilaktyce chorób cywilizacyjnych o podłożu wolnorodnikowym oraz wspomagająco w terapii stanów zapalnych i chorób nowotworowych układu krwiotwórczego.

Ad.6. Ocena prawidłowości wnioskowania

Autorka sformułowała poprawnie 14 wniosków, w których przedstawiła najważniejsze wyniki dobrze udokumentowanych własnych badań. Mankamentem jest, że one zbyt ogólne bez podania najważniejszych przykładów liczbowych.

Ad..7. Ocena końcowa

Oceniając merytorycznie przedłożoną do recenzji pracę doktorską mgr inż. Urszuli Szymanowskiej stwierdzam, że Autorka wykazała się gruntowną znajomością tematyki badań, poprawnie zaplanowała i wykonała dużą ilość pracochłonnych badań, wykazując się umiejętnością wykonywania różnorodnych analiz z użyciem nowoczesnych technik, uzyskując wartościowe wyniki. Na podstawie swych badań Autorka przedstawiła bardzo obszerny materiał dotyczący zawartości związków polifenolowych i aktywności biologicznej malin i otrzymanych z nich produktów. Wyniki tej pracy stanowią ważny wkład w poznanie składu związków i aktywności przeciwutleniającej, przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych malin i ich przetworów. Praca zawiera elementy nowości naukowej, zwłaszcza w zakresie badań nad hamowaniem aktywności enzymów prozapalnych i komórek nowotworowych białaczki. Duża ilość doświadczeń wniosła wiele nowych informacji z ważnego dla nauki i praktyki zakresu badań.

Zastosowanie do badań odpowiednich metod analitycznych dało wiele wartościowych oryginalnych wyników. Dużą wartość naukową i praktyczną mają wyniki badań uzyskane dla cennego surowca jagodowego uprawianego powszechnie w Polsce jakim są maliny. Oryginalnością w pracy były kompleksowe badania nad surowcem, produktami którymi były

soki i syropy malinowe oraz materiałem odpadowym wyciekami powstającymi w procesie produkcji soku. Dużą wartość praktyczną dla przetwórci owoców w Polsce mają także wyniki badań preparatów enzymatycznych stosowanych w produkcji soków.

Niewielka ilość uwag krytycznych recenzenta ma charakter dyskusyjny. Oceniający głównie skupił się na błędach, które należałoby skorygować w przygotowywaniu pracy do druku.

Diskusyjne uchybienia w pracy nie umniejszają jej wartości merytorycznej. Uważam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa mgr inż. Urszuli Szymanowskiej w pełni odpowiada wymogom art. 20, punkt 1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 03,65,595) stawianym pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

