

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Kingi Żurek pod tytułem „Wykorzystanie głogu (Crataegus L.) do produkcji skoncentrowanych preparatów roślinnych w wysokiej zawartości związków biologicznie czynnych” napisanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Ireneusza Kapusty, prof. UR jako promotora i dr inż. Tomasza Cebulaka, jako promotora pomocniczego

Podstawą formalną wykonania recenzji jest Uchwała Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 12 lipca 2022 roku, podjęta na podstawie art. 190 ust. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jedn. Dz. U. 2020 poz. 85 ze zm.).

Uwagi ogólne

Rozprawa liczy łącznie 167 ponumerowanych stron, w tym zawiera 122 strony zasadniczego tekstu, 14 stron spisu literatury zawierającego 225 pozycji, 31 rycin, 20 tabel, 5 wykresów oraz 24 załączniki. Spośród cytowanych prac tylko jedna opublikowana jest w języku polskim, natomiast pozostałe pozycje, to prace w języku angielskim. 134 cytowane przez doktorantkę prace pochodzą z ostatnich 10 lat, natomiast 15 z ostatnich dwóch lat. Po spisie treści, przed zasadniczym tekstem znajduje się wykaz użytych skrótów, co ułatwia zapoznanie się z treścią pracy. Streszczenie w języku polskim oraz angielskim autorka zamieściła na końcu pracy przed bibliografią. Uważam, że ta część rozprawy powinna się znaleźć na początku, tuż za spisem treści.

Za podstawę oceny przyjęto następujące kryteria: aktualność tematyki rozprawy, możliwość praktycznego zastosowania uzyskanych wyników badań, prawidłowość postawienia problemu badawczego, zastosowane metody dla rozwiązania problemu naukowego, stronę merytoryczną i formalną rozprawy.

Szczegółowa ocena treści

Rozprawa w swej części merytorycznej obejmuje 7 rozdziałów. Pierwszy rozdział stanowi wstęp, w którym kandydatka uzasadniła podjęcie tematu. Stwierdziła, iż w związku ze stale rosnącym zapotrzebowaniem rynku żywności na opracowanie nowych produktów żywnościowych, wciąż poszukiwane są nowe surowce roślinne, stanowiące bogate źródło związków bioaktywnych. Jednym z gatunków powszechnie stosowanym z medycynie ludowej i znanym z prozdrowotnego działania jest Głóg (*Crataegus* L.). Jednakże pomimo udokumentowanego działania między innymi w profilaktyce chorób układu krążenia, preparaty z tego gatunku nie są rozpowszechnione na rynku żywnościowym. Z tego powodu kandydatka proponuje wyodrębnienie związków polifenolowych z owoców, liści i kwiatów głogu i pozyskanie z nich preparatów o wysokiej zawartości związków bioaktywnych.

W dalszej części rozdziału doktorantka dokonuje szczegółowej charakterystyki gatunku zarówno pod względem botanicznym i morfologicznym, jak i chemicznym. W przeglądzie piśmiennictwa dotyczącego stanu wiedzy zawartej w literaturze przedmiotu, kandydatka szczegółowo analizuje aktywność prozdrowotną głogu oraz zawartych w nim bioaktywnych związków. Pani magister charakteryzuje poszczególne grupy związków polifenolowych występujących w przedmiotowym gatunku. Dokonuje ich podziału ze względu na budowę chemiczną, a także opisuje udowodnione właściwości prozdrowotne, charakterystyczne dla poszczególnych grup polifenoli. W podrozdziale 1.2.1, kandydatka opisuje mechanizm działania polifenoli w procesach zapalnych oraz w procesach nowotworowych.

W podrozdziale 1.3 kandydatka omówiła możliwości ekstrakcji fitozwiązków z produktów roślinnych. W przeglądzie literatury mgr Natalia Żurek skupiła się na omówieniu mechanizmu ekstrakcji oraz wpływu stosowanych warunków na jej wydajność. Następnie opisała konwencjonalne i niekonwencjonalne techniki ekstrakcji, powszechnie stosowane w procesach przemysłowych. W tej części pracy skupiła się również na szczegółowym omówieniu techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE), którą stosuje w części eksperymentalnej pracy.

W ostatnim podrozdziale wstępu Pani magister przedstawia zagadnienia dotyczące nutraceutyków – dokonuje charakterystyki grupy, omawia ich działanie na organizm ludzki oraz wymienia wyzwania, jakie stoją przed branżą spożywczą w sektorze produkcji tych preparatów.

Podsumowując zawartość całego rozdziału, który jest poświęcony omówieniu stanu dostępnej wiedzy dotyczącej podjętych przez kandydatkę badań stwierdzam, że kandydatka prawidłowo

przedstawiła stan wiedzy istniejący w literaturze przedmiotu. Pewien niedosyt budzi jednak brak szczegółowego opisu poszczególnych, niekonwencjonalnych technik ekstrakcji. Autorka nie rozważyła wpływu poszczególnych technik na stabilność związków polifenolowych, stosowanych metod poprawy tej stabilności oraz możliwości doboru techniki do konkretnej grupy związków polifenolowych.

Hipotezy i problemy badawcze oraz cel pracy

Hipotezy i problemy badawcze przedstawione zostały w drugim, natomiast cel w trzecim rozdziale pracy. Wyodrębnionych zostało pięć hipotez, które bezpośrednio prowadzą do sformułowania celów badawczych. Podstawowym celem badawczym była ocena możliwości wykorzystania głogu do produkcji preparatów w postaci wyodrębnionej i skoncentrowanej frakcji związków polifenolowych.

Dla realizacji postawionego celu kandydatka sformułowała siedem celów szczegółowych. Postawione cele szczegółowe koncentrują się na charakterystyce fitozwiązków otrzymanych z głogu oraz standaryzacji metody ich ekstrakcji. Ekstrakcja związków polifenolowych metodą SPE jest powszechnie stosowaną techniką mającą zastosowanie w analityce chemicznej. Metoda ta służy do oczyszczenia próbki z kwasów, cukrów i substancji wielkocząsteczkowych rozpuszczalnych w wodzie oraz do zatężenia frakcji polifenolowej surowca. Powszechnie stosuje się ją także przy spektrometrii mas w celu pozbycia się zanieczyszczeń i uzyskania wysokiego stężenia związków polifenolowych, co skutkuje otrzymaniem pełnego profilu polifenoli w badaniach chromatograficznych. W mojej opinii kandydatka powinna rozwinąć omawiany problem poprzez możliwości zastosowania uzyskanych preparatów w przetwórstwie spożywczym. Ciekawym zagadnieniem byłoby określenie trwałości i stabilności preparatów zarówno w procesach technologicznych jak i w trakcie przechowywania samych preparatów. Należałoby zbadać w jaki sposób wyodrębnione związki polifenolowe reagują na podwyższoną temperaturę procesów przetwórczych, obecność tlenu, zmianę pH czy środowisko wodne panujące w przetworach. Czy potrzebna jest stabilizacja preparatów za pomocą nośników? Jak preparaty wpływać będą na barwę produktów spożywczych, do których zostaną dodane? Czy konieczne są szczególne warunki przechowywania preparatów przed ich zastosowaniem w produktach? Przeprowadzone przez Panią magister badania stanowią wstęp do kolejnych etapów badawczych i przetwórczych, mający na celu wyodrębnienie najlepszego surowca do produkcji nutraceutyków roślinnych.

Materiał i metody

Materiał badawczy oraz stosowane przez kandydatkę metody badań przedstawione są w rozdziale czwartym. W dwóch pierwszych podrozdziałach kandydatka przedstawia spis odczynników oraz aparatury badawczej użytej w trakcie realizacji pracy. Podrozdział 4.3 dotyczy materiału badawczego. Kandydatka w swoich badaniach wykorzystwała różne części morfologiczne (owoce, kwiaty i liście) pochodzące z sześciu gatunków głogu pozyskanego w 2016 roku. W tym miejscu nasuwa się pytanie dotyczące liczby przebadanych próbek. Dlaczego kandydatka w ciągu czterech lat prowadzenia badań przeanalizowała materiał badawczy pochodzący z jednego okresu wegetacyjnego? Bardzo ciekawym zagadnieniem byłoby wykazanie zmienności materiały w trakcie różnych okresów wegetacyjnych. Jeśli chodzi o zliofilizowany materiał badawczy, proszę o doprecyzowanie w jaki sposób był on zabezpieczony przed czynnikami zewnętrznymi? Czy określono zmiany wilgotności materiałów badawczych w trakcie przechowywania zamrażalniczego?

Kolejny podrozdział dotyczy stosowanych przez kandydatkę metod ekstrakcji. W swojej pracy badawczej Pani magister stosowała ekstrakcję wodną i alkoholową, a także ekstrakcję do fazy stałej. Moje zastrzeżenia budzą zastosowane warunki ekstrakcji wodnej i alkoholowej. Proszę wyjaśnić, dlaczego próbki ekstrahowane były w temperaturze pokojowej, a nie w temperaturze chłodniczej? Przy tak długim procesie ekstrakcji, wynoszącym 24 godziny część związków polifenolowych z pewnością uległa rozkładowi, wpływając negatywnie na wydajność ekstrakcji. Czy w trakcie działania ultradźwięków monitorowany był wzrost temperatury próbek? Jest to kolejny czynnik mogący mieć znaczenie przy oznaczeniach zawartości polifenoli.

Kolejne pytanie dotyczy ekstrakcji do fazy stałej. W opisie metody kandydatka pisze, że kolumny z naniesionymi próbkami przemywano 50 mililitrami zakwaszonej wody destylowanej. Czy w trakcie przemywania próbki monitorowany był ekstrakt eluatu? Jeśli tak, to przy jakim ekstrakcie zakończone było przemywanie? Przemywanie próbek naniesionej na kolumnę ma na celu usunięcie z niej cukrów, kwasów i substancji wielkocząsteczkowych. Przemywanie powinno się prowadzić do momentu wymycia wyżej wymienionych związków, a więc do uzyskania ekstraktu równego 0 °Brix.

Mam również kilka pytań odnośnie analiz chromatograficznych i spektrometrii mas. Proszę o doprecyzowanie, ze standardami których związków porównywane były otrzymane wyniki? Proszę również o informację, dla których związków wykonane zostały krzywe kalibracyjne służące do późniejszych przeliczeń zawartości związków polifenolowych oraz

wyszczególnienie jakie związki referencyjne użyte zostały przy poszczególnych, zidentyfikowanych związkach polifenolowych do przeliczeń. Jakie były zakresy stężeń przy wykonywaniu krzywych kalibracyjnych oraz jaki był ich współczynnik R^2 ?

Moje zastrzeżenia budzi również sposób obliczenia wydajności ekstrakcji, a więc podrozdział 4.4.6.1. W przypadku opisanym przez kandydatkę porównuje ona masę zliofilizowanych owoców, liści lub kwiatów, w zależności od wariantu, do masy zliofilizowanych ekstraktów otrzymanych w trakcie ekstrakcji wodnej/alkoholowej oraz ekstrakcji SPE. W takim sposobie obliczeń widoczny jest wyraźny błąd. W masie zliofilizowanej próbki głogu, oprócz związków polifenolowych możemy wykazać wszystkie inne składniki rośliny. W takim przypadku przy porównaniu masy głogu do masy otrzymanych ekstraktów nie pokazuje się wydajności ekstrakcji, a jedynie zawartość procentową wyekstrahowanych związków – w przypadku ekstrakcji wodnej i alkoholowej zawartość polifenoli oraz pozostałych substancji wyekstrahowanych z próbki, takich jak na przykład cukry, kwasy i substancje wielkocząsteczkowe, natomiast w przypadku preparatu oczyszczonego na kolumnach chromatograficznych – zawartość związków polifenolowych. Jeśli chcielibyśmy pokazać wydajność ekstrakcji, wtedy masę ekstraktów i preparatów powinniśmy porównywać z zawartością samych związków polifenolowych w surowcu. W tym przypadku uzyskane przez kandydatkę wyniki (opisane w dalszej części pracy) są nielogiczne – otrzymała ona większą wydajność ekstrakcji związków polifenolowych w przypadku zastosowania tradycyjnej metody wodnej i alkoholowej, natomiast w przypadku metody SPE, którą sama zaliczyła do technik niekonwencjonalnych, mających na celu zwiększenie tejże wydajności, otrzymane wyniki były kilkukrotnie niższe.

Omówienie wyników i dyskusja

Rozdział piąty obejmuje 74 strony i poświęcony jest omówieniu i dyskusji uzyskanych wyników. W rozdziale tym kandydatka dokonuje doboru metody ekstrakcji związków polifenolowych z poszczególnych części morfologicznych głogu, a także porównuje zastosowanie trzech złożeń chromatograficznych – RP-18, Amberlite XAD-2 oraz Oasis HLB – w otrzymywaniu oczyszczonych preparatów polifenolowych. W ekstraktach uzyskanych metodami konwencjonalnymi i niekonwencjonalnymi kandydatka dokonuje oceny zawartości związków polifenolowych, pojemności przeciwutleniającej, właściwości cytotoksycznych oraz parametrów fizyko-chemicznych.

W celu wybrania najlepszych warunków ekstrakcji kandydatka porównała wyniki zawartości polifenoli ogółem, zawartości flawonoidów ogółem, zawartości procyanidyn ogółem oraz pojemności przeciwutleniające w ekstraktach uzyskanych z użyciem wody, 50% i 70% etanolu oraz 50% i 70% metanolu. Ekstrakcje prowadzone były w czasie 2 i 24 godzin oraz w połowie przypadków wspomagane były ultradźwiękami. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów jako najskuteczniejsze, wybrane zostały następujące warunki ekstrakcji: dla owoców był to 70% etanol z 2-godzinną ekstrakcją wspomaganą ultradźwiękami, dla liści 24-godzinna ekstrakcja 70% etanolem, natomiast dla kwiatów – 50% etanol z 2-godzinną ekstrakcją wspomaganą ultradźwiękami. Proszę o wyjaśnienie jaki czynnik mógł spowodować obniżenie zawartości flawonoidów i procyanidyn ogółem po zastosowaniu ultradźwięków w przypadku etanolu i metanolu?

W dalszej części rozdziału kandydatka dokonuje oceny zawartości związków polifenolowych w otrzymanych ekstraktach z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych oraz chromatograficznych. W tym podrozdziale zwracam uwagę na zastosowanie niefortunnego stwierdzenia, iż „polifenole ogółem były dominującą grupą związków”. Termin ‘polifenole ogółem’ dotyczy wszystkich oznaczonych tą metodą grup związków polifenolowych – stanowi zbiór poszczególnych grup związków polifenolowych.

W podrozdziale 5.3.1, dotyczącym profilu związków polifenolowych oznaczonych z wykorzystaniem spektrometrii mas, proszę o podanie informacji przy jakich długościach fal dokonano odczytu poszczególnych grup związków polifenolowych. Na stronie 58, w linii 23 widnieje błąd – zamiast utraty heksozy, powinna być utrata pentozy.

Przy identyfikacji związków polifenolowych pomocne jest analizowanie ich czasu retencji. W przypadku izomerów kwasów fenolowych, takich jak kwasy kawoilo-chinowe, w jednej próbce może występować kilka izomerów, posiadających tą samą masę piku pseudomolekularnego oraz jonów potomnych, natomiast różniących się siłą sygnału poszczególnych pików i ich czasem retencji. Kandydatka w preparatach głogu zidentyfikowała trzy kwasy kawoilo-chinowe: kwas 3-O-, 4-O- i 5-O-kawoilo-chinowy. Niestety, w wynikach przedstawionych w tabelach panuje bałagan: raz jako pierwszy wykazany jest kwas 3-O-kawoilo-chinowy, w kolejnej tabeli kwas 4-O-kawoilo-chinowy, natomiast w tabeli 10 nagle pojawia się kwas 5-O-kawoilo-chinowy. We wszystkich przypadkach związki te mają tą samą masę pseudomolekularną i takie same masy rozpadu. W jaki sposób kandydatka identyfikowała poszczególne kwasy? Czy brany był pod uwagę kolejność wymywania kwasów kawoilo-chinowych z kolumny chromatograficznej? Proponuję, aby kandydatka zaznajomiła się

z literaturą dotyczącą tego tematu (10.1016/j.phytochem.2011.02.027), co pomoże jej w identyfikacji poszczególnych izomerów kwasów fenolowych. Proszę o uzupełnienie tabel 8-10 o czasy retencji związków. Ponadto mam kilka uwag dotyczących numerowania pików. Po pierwsze piki powinny być ponumerowane po kolei, według czasu retencji – unikamy w ten sposób sytuacji, w której na chromatogramie piki, którym nadaliśmy niższe numery znajdują się za pikami o wyższych numerach. Po drugie – proszę we wszystkich tabelach i na wszystkich chromatogramach przyjąć jeden numer dla konkretnego związku. Na przykład, jeśli w owocach dimer procyanidyny jest oznaczony jako pik numer 1, to w liściach i kwiatach powinien mieć on ten sam numer. Po trzecie, nie można nadać dwóm różnym pikom tych samych numerów – są to dwa różne związki. W przypadku związków o takiej samej masie, proszę do nazwy związku dodać 'izomer 1', 'izomer 2' itd., a piki ponumerować według kolejności wymywania z kolumny.

W kolejnych podrozdziałach kandydatka opisuje wyniki analiz właściwości przeciwutleniających, fizyko-chemicznych oraz aktywności cytotoksycznej. Oceniam, że podrozdziały te napisane są prawidłowo. Proszę o doprecyzowanie w jakim momencie wykonane zostały badania wilgotności? Zaraz po zliofilizowaniu, czy po przechowywaniu chłodniczym? Proszę również o krytyczne przyjrzenie się wynikom wydajności ekstrakcji.

Wnioski

W ostatnim, szóstym rozdziale rozprawy mgr Natalia Żurek przedstawiła dwanaście wniosków, które sformułowała na podstawie uzyskanych wyników badań i przeprowadzonej dyskusji. Oceniam, że wnioski te sformułowane są prawidłowo i dostatecznie odpowiadają na postawiony problem badawczy. Wynikają one z przeprowadzonych badań i zastosowanych procedur. Potwierdzają również zdolność doktorantki w analizowaniu uzyskanych wyników.

Struktura rozprawy

Wszystkie części rozprawy tworzą spójną i merytorycznie zwartą całość, podporządkowaną realizacji celu postawionego przez autorkę. Objętość rozprawy jest właściwa. Podjęty problem badawczy jest aktualny i ma znaczenie dla rozwoju wiedzy dotyczącej pozyskiwania i wykorzystania związków bioaktywnych z surowców roślinnych. Doktorantka w swej rozprawie przedstawiła wystarczająco umotywowaną oraz samodzielnie opracowaną koncepcję pozyskiwania preparatów bioaktywnych z glogu. Przedstawiona koncepcja ma charakter

aplikacyjny, a po dalszych badaniach może zostać zaimplementowana w praktyce przetwórczej.

Autorka wykazała się poprawnością w planowaniu poszczególnych etapów badawczych, o czym świadczy sekwencja kolejno wykonywanych działań badawczych i eksperymentalnych. Praca napisana jest językiem naukowym, poprawnym i zrozumiałym. W pracy występują błędy edytorskie, interpunkcyjne i frazeologiczne, jednakże nie wpływają one na przedstawioną treść pracy. Tytuł rozprawy odzwierciedla jej treść i zawartość.

Ocena merytoryczna i formalna rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Natalii Kingi Żurek wykazuje właściwy poziom naukowy. Napisana jest starannie, a jej układ jest poprawny. Doktorantka wykazała się właściwą wiedzą w zakresie omawianej problematyki.

Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Kingi Żurek pt. „Wykorzystanie głogu (*Crataegus* L.) do produkcji skoncentrowanych preparatów roślinnych w wysokiej zawartości związków biologicznie czynnych” napisanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Ireneusza Kapusty, prof. UR oraz dr inż. Tomasza Cebulaka, w mojej ocenie odpowiada wymogom określonym dla rozpraw doktorskich określonych w art. 187. ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jedn. Dz.U. 2020 poz. 85 ze zm.). W związku z tym wnioskuję o jej przyjęcie przez Radę Naukową Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego oraz dopuszczenie Pani mgr inż. Natalii Żurek do publicznej obrony.

Joanna Kobińska-Ostępa