

Wrocław, 21.03.2017 r.

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

R E C E N Z J A rozprawy doktorskiej

Recenzja przedłożonej rozprawy doktorskiej mgr inż. Jakuba Macierzyńskiego pt. ”**Skład polifenolowy owoców i przetworów oraz charakterystyka produktów hydrolizy oligomerycznych elagotanin jeżyny *Rubus fruticosus*”**, wykonanej w Instytucie Technologii i Analizy Żywności w Politechnice Łódzkiej 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

Szerokie zainteresowanie związkami polifenolowymi wynika z przypisywania im wielu aktywności biologicznych, korzystnie wpływających na organizm ludzki. Szczególne znacznie w tym zakresie mają ich właściwości przeciwutleniające wynikające ze zdolności zmiatania wolnych rodników, które przyczyniają się do wywoływania chorób cywilizacyjnych jak np. miażdżyca, cukrzyca czy choroby nowotworowe. W żywności związki polifenolowe wpływają na cierpki i gorzki smak, barwę oraz tworzenie zmętnień i osadów w sokach, winie i piwie. Cechą tych związków jest duża różnorodność budowy chemicznej i powszechność występowania w surowcach roślinnych. Doskonalenie technik analitycznych w celu poznania ich struktury, przemian w procesie przetwarzania i poszukiwanie nowych surowców zasobnych w polifenole jest przedmiotem wielu aktualnych badań. Praca doktorska mgr inż. Jakuba Macierzyńskiego poświęcona jest tym zagadnieniom. Tematem Jego rozprawy są związki polifenolowe owoców jeżyn, w tym szczególnie elagotaniminy. Są to najtrudniejsze w zakresie badawczym, o złożonej budowie chemicznej,

najmniej poznane związki polifenole. Praca dotyczyła opracowania metod ekstrakcji i oczyszczania preparatów elagotanin oraz oznaczenia ich zawartości w sześciu odmianach uprawnych i dwóch ze stanowisk naturalnych jeżyn. Dużą i wyjątkowo trudną część badań poświęcił Autor produktom przemian oczyszczonych standardów pojedynczych elagotanin w reakcjach depolimeryzacji, degradacji i destrukcji w wybranych warunkach pH i temperatury. Są to pionierskie badania z tego zakresu. Z wykorzystaniem najnowocześniejszej aparatury analitycznej jak chromatografia cieczowa ze spektrometrią masową (HPLC/ DAD/MS) zidentyfikował i ocenił zawartość oraz analizował przemiany najmniej poznanych wśród polifenoli elagotanin jeżyn. Ponadto wykonał badania przemian elagotanin w procesie otrzymywania soków i win z owoców jeżyn.

Praca ma dużą wartość praktyczną i poznawczą, w tym szczególnie w ocenie reakcji przemian w układach modelowych, otrzymanych we własnym zakresie pojedynczych standardów, trzech oligomerycznych elagotanin. Doktorant podjął się bardzo trudnego, ważnego dla nauki i praktyki interesującego tematu badań.

Ad. 2. Ocena bibliografii i znajomości literatury

Bibliografia pracy jest bogata, liczy 143 pozycje w tym 4 strony internetowe. Wszystkie cytowane pozycje bibliograficzne są ściśle związane z tematem badań. Zdecydowana większość z nich jest z ostatniego dziesięciolecia. Wśród cytowanych prac 123 jest opublikowanych w języku angielskim, świadczy to o oryginalności i pionierskości podjętego tematu badań w Polsce. 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 zawiera 171 stron tekstu łącznie z wykazem literatury. Konstrukcja pracy jest zgodna z wymogami pisania rozpraw i oparta na podziale rzeczowym. Składa się z przeglądu piśmiennictwa, celu pracy, rozdziałów części doświadczalnej obejmujących opis materiału, metod eksperymentalnych i analitycznych, przedstawienia dyskusji i podsumowania wyników oraz wniosków. Rezultaty badań zamieszczone są na 40 dobrze przygotowanych rysunkach, 5 schematach i w 32 tabelach.

W pierwszym rozdziale pracy, w przeglądzie piśmiennictwa na 15 stronach przedstawione są zagadnienia dotyczące owoców jeżyny, jej wartości użytkowej, odżywczej i

prozdrowotnej. Dalsza część poświęcona jest elagotaninom, które są głównym przedmiotem badań w rozprawie. Zamieszczone są informacje o budowie i właściwościach chemicznych elagotanin, ich wzory strukturalne obrazujące wyjątkowo złożoną budowę chemiczną. Dodatkowe dane dotyczą metabolizmu i właściwości prozdrowotnych, biosyntezy i przemian tych związków. W ostatniej części tego rozdziału Autor przedstawił informacje o oznaczaniu i identyfikacji elagotanin. Wszystkie te zagadnienia opracowane są bardzo starannie w oparciu o bogatą zagraniczną bibliografię i ściśle wiążą się z przedmiotem rozprawy doktorskiej. Na szczególne podkreślenie w tej części pracy zasługuje zilustrowanie budowy i przemian tych związków 6 rysunkami.

Do tej części rozprawy mam drobne uwagi. Autor używa określenia na stronie 12 (w.13) „enzymacja”, moim zdaniem poprawniej należy użyć „obróbka enzymatyczna”. Niepoprawna jest informacja strona 12 (w.21-22) „flawonoidy i antocyjany”, poprawnie to „flawonoidy i w tym antocyjany” (antocyjany należą do flawonoidów). Na stronie 24 (w.26) powinno być „Scalbert i inni użyli”. Autor w tej części i całości pracy niepoprawnie stawia kropki po tytułach rysunków i tabel. Do tej części pracy nie mam żadnych innych zastrzeżeń.

Cel pracy został poprawnie sformułowany, zawiera uzasadnienie oraz w pięciu punktach zakres pracy. Po tytule rozdziału też nie stawia się kropek (s. 27, w.1).

W części doświadczalnej pracy na 20 stronach zaprezentowany jest opis materiału badawczego i wykonania doświadczeń oraz zastosowane metody analityczne. Dla przejrzystości śledzenia wykonywanych doświadczeń brak jest przedstawienia w tej części pracy schematów ich organizacji.

Rozdział „3. Wyniki badań, ich omówienie i dyskusja” jest podzielony w logiczny sposób na cztery podrozdziały zgodnie z kolejnością przeprowadzonych doświadczeń. Łatwo można śledzić kolejne etapy poczynając od charakterystyki składu chemicznego badanych odmian jeżyn, następnie otrzymywania preparatów i pojedynczych elagotanin, kolejno ich przemian w układach modelowych oraz przetworach z jeżyn na soki i wina. Wyniki badań są bogato ilustrowane dobrze przygotowanymi rysunkami, tabelami oraz uzupełnione obliczeniami statystycznymi. W tej części, moim zdaniem zbędne było cytowanie w 46 wierszach rozprawy zbiorowej publikacji Autora z czasopisma Żywność bez dołączenia tej publikacji. Brak tabel i rysunków z wynikami uniemożliwia śledzenie obszernego opisu umieszczonego w cudzysłowie (s.52-54). Tabelę 3.1.1. (s.53) lepiej byłoby zamieścić po stronie 50 niż po 52. Wyniki badań w postaci tabel i rysunków zamieszcza się zwykle najbliżej miejsca w którym są omawiane. Strona 61 (w.21) symbolu „%” w tekście pracy używa się gdy podane są razem z wartościami liczbowymi, w przeciwnym wypadku podaje

się słownie „wyrażonego w procentach”. Strona 83 (w.5) zamiast na „chromatografie” powinno być na „chromatogramie”, podobnie w podpisie rys.3.2.25. W dalszej części rozprawy Autor zamieścił 10 stronicowe podsumowanie poszczególnych podrozdziałów.

W końcowej części rozprawy doktorskiej mgr inż. Jakub Macierzyński przedstawił dziewięć wniosków dotyczących najważniejszych wyników. Dwa ostatnie rozdziały to spis literatury i załączniki .

Ad.4.Ocena zastosowanej metodyki badań

Autor wykazał się dobrym opanowaniem różnorodnych technik analitycznych, w tym szczególnie nowoczesnych metod chromatograficznych jak: chromatografia kolumnowa, cieczowa wysokosprawna (HPLC-DAD) preparatywna i analityczna z analizą widm masowych (HPLC-MS). Ponadto stosował w swych badaniach metody enzymatyczne w analizie błonnika. Zastosowane metody były wyjątkowo złożone i czasochłonne, wymagały dużego nakładu pracy, pozwoliły zrealizować założony ambitny cel badań. Na szczególne podkreślenie zasługują jakościowe oznaczenia elagotanin i produktów ich przemian z wykorzystaniem chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas. Identyfikacja tych związków o wyjątkowo złożonej budowie chemicznej, wraz z produktami ich fragmentacji, wymagała dużego doświadczenia i wiedzy. Godnym podkreślenia jest duży sukces w uzyskaniu pojedynczych elagotanin o wysokiej czystości izolowanych z jeżyn metodą kolumnowej chromatografii na różnych żywicach i z wykorzystaniem wysokociśnieniowej chromatografii preparatywnej (HPLC).

W metodzie HPLC analizy zawartości cukrów nie podano autora wg kogo przygotowywano i oznaczano te związki.

Zastosowane metody analityczne były właściwie dobrane i pozwoliły na zrealizowanie celu pracy. Na podkreślenie zasługuje duża ilość bardzo trudnych, czasochłonnych i pracochłonnych badań, których wyniki znacznie przewyższają zakres jednej pracy doktorskiej.

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

Przedmiotem badań zgodnie z tematem rozprawy była analiza związków polifenolowych owoców i przetworów oraz charakterystyka produktów hydrolizy oligomerycznych elagotanin jeżyny *Rubus fruticosus*. Autor w pierwszym etapie badań analizował skład chemiczny sześciu odmian jeżyn uprawnych i owoców pozyskanych z

dwóch stanowisk naturalnych. Analizowane były podstawowe składniki jak: zawartość suchej substancji, popiołu, białka, cukrów, kwasowość i frakcje błonnika w próbkach jeżyn z dwóch sezonów upraw. Badania te wykazały duże zróżnicowanie w zależności od odmiany i sezonu zbioru. Natomiast w rozprawie nie przedstawiono wyników badań związków polifenolowych w jeżynach tylko Autor zacytował fragment współautorskiej publikacji tych wyników. Moim zdaniem sam opis i dyskusja bez zamieszczenia wyników jest niewystarczające.

W dalszej części rozprawy przedstawiono wyniki analiz ilościowych elagotanin w owocach jeżyn pochodzących z upraw i stanu naturalnego. Wyniki te mają dużą wartość poznawczą, gdyż dotychczas z powodów braku standardów dla tych związków nie było możliwości analiz ilościowych. Autor wykazał duże zróżnicowanie pod względem zawartości elagotanin w owocach jeżyn w zależności od odmiany, sezonu oraz pochodzenia z upraw i zbioru naturalnego. Interesujące są nowe informacje o elagotaninach jeżyn, które uzyskano oceniając ich zawartość w poszczególnych częściach anatomicznych jak: nasiona, dno kwiatowe, skórki i miąższ. Godnym podkreślenia są wyniki wskazujące, że największy ponad 80% udział w zawartości elagotanin owoców jeżyn mają nasiona. Może mieć to znaczenie praktyczne np. w otrzymywaniu preparatów elagotanin z wyłoków pochodzących z produkcji soków z tych owoców, w których nasiona stanowią duży udział. Autor badał także wpływ dojrzałości owoców na zawartość elagotanin wykazując większą ich ilość w niedojrzałych owocach w stosunku do dojrzałych.

Duży wkład pracy i czasu poświęcił Doktorant w otrzymaniu preparatów elagotanin jeżynowych a zwłaszcza na wyodrębnienie pojedynczych substancji. Tę część pracy uważam za najbardziej cenną. Brak komercyjnych standardów elagotanin z powodu trudności ich izolacji uniemożliwia ich identyfikację, a zwłaszcza oznaczenia ilościowe. Wykorzystując różne adsorbenty w chromatografii kolumnowej i preparatywną chromatografię HPLC uzyskał wysokiej czystości pojedyncze związki elagotanin przydatne do oznaczeń ilościowych. Pozyskanie tych substancji z wyłoków jeżyn wymagało bardzo dużej ilości prób, które były pracochłonne i czasochłonne. Wyniki tych doświadczeń są dobrze udokumentowane chromatogramami z rozdziałów chromatografii preparatywnej HPLC i z kolumnowej z użyciem wypełnienia różnymi żelami. Budowa tych związków została potwierdzona metodą spektrometrii masowej MS z fragmentacją i widm UV-Vis. Ten trudny etap pracy oceniam bardzo wysoko. Doktorant wykazał się dużą dociekliwością i wykorzystując nowoczesne techniki stosowane w preparatyce i analityce związków fenolowych osiągnął założony cel.

Uzyskanie oczyszczonych związków elagotanin: sanguiny H-6, lambertiaminy C oraz posiadanie jako substancji odniesienia agrimoniny wyizolowanej z truskawek pozwoliło na przeprowadzanie w układach modelowych interesujących badań depolimeryzacji, degradacji i destrukcji w dobranych odpowiednich warunkach pH, temperatury i czasu reakcji. Z wykorzystaniem chromatografii cieczowej HPLC-DAD-MS Autor ocenił i scharakteryzował ilościowo i jakościowo trwałość oraz produkty przemian tych związków. Badania te są pionierskie i mają dużą wartość poznawczą wnoszą nowe informacje do nauki o przemianach, dotychczas mało poznanych w tym zakresie elagotanin. Uzupełnieniem tych doświadczeń będą badania spektroskopowe NMR, które jak stwierdził Doktorant są toku.

Dużą wartość praktyczną mają wyniki badań przedstawione w czwartym etapie dotyczące zawartości elagotanin w sokach i winach otrzymanych z owoców jeżyn. Autor wykazał, że w procesie otrzymywania soku z tych owoców główna część około 80% elagotanin pozostaje w wytlókach w nierozpuszczalnej frakcji. Zjawisko to wyjaśniają wcześniejsze Jego doświadczenia wskazujące na główną zawartość tych związków w nasionach a nie w miąższu z którego otrzymuje się sok. Natomiast w procesie otrzymywania wina z jeżyn w czasie maceracji miazgi przechodziło 2,4 krotnie więcej elagotanin do wina niż do soku klarownego. Ze względu na zawartość elagotanin korzystniej jest produkować z jeżyn wino niż klarowny sok, w którym odpowiednio do wina przechodzi 41,5% tych związków z owoców a do soku tylko 17,4%.

Godnym uwagi jest właściwa interpretacja wyników badań oraz ich dyskusja i wyjaśnienia złożonych struktur przemian elagotanin, dzięki dobremu opanowaniu trudnej techniki analitycznej HPLC-DAD-MS.

Ad.6. Ocena prawidłowości wnioskowania

Autor sformułował poprawnie 10 wniosków w których przedstawił najważniejsze wyniki. Za szczególnie cenne uważam wnioski dotyczące charakterystyki przemian elagotanin w reakcjach hydrolizy i depolimeryzacji.

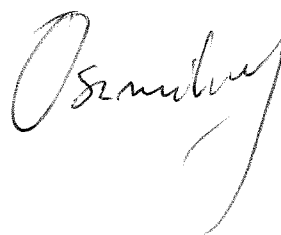
Ad..7. Ocena końcowa

Oceniając merytorycznie przedłożoną do recenzji pracę doktorską mgr inż. Jakuba Macierzyńskiego stwierdzam, że Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością trudnej tematyki badań, poprawnie zaplanował i wykonał eksperymenty uzyskując dużą ilość

wartościowych wyników. Szczególnie należy podkreślić bardzo duży zakres różnorodnych, czasochłonnych doświadczeń i analiz. Na podstawie swych badań Autor przedstawił obszerny materiał dotyczący dotychczas mało poznanych elagotanin zawartych w jeżynach i ich przemian. Wyniki tej pracy stanowią ważny wkład w opracowanie metod izolacji i poznanie przemian w układach modelowych związków fenolowych o wyjątkowo złożonej strukturze. Praca zawiera elementy nowości naukowej, zwłaszcza w zakresie pionierskich badań dotyczących izolacji, przemian i zawartości elagotanin jeżyn. Duża ilość doświadczeń wniosła wiele nowych informacji z ważnego dla nauki i praktyki zakresu badań.

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. Jakuba Macierzyńskiego 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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Osmond' or similar, written in a cursive style.