



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

KATEDRA TECHNOLOGII OWOCÓW, WARZYW I NUTRACEUTYKÓW ROŚLINNYCH

Wrocław, 22.11.2021 r.

Dr hab. inż. Anna Sokół-Łętowska prof. UPWr
Katedra Technologii Owoców Warzyw
i Nutraceutyków Roślinnych
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

Rozprawy doktorskiej magister inżynier Dominiki Kajszcak pod tytułem: „Bioaktywne związki kaliny koralowej i ich potencjał prozdrowotny” wykonanej w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Podsędek.

Podstawą formalną do wykonania recenzji jest Uchwała nr 55/2021 Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej z dnia 6 lipca 2021 podjęta na podstawie art.190 ust 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

1. Dobór i znaczenie tematu

Kalina koralowa, którą Doktorantka wybrała jako obiekt swoich badań jest rośliną, która była od dawna stosowana w lecznictwie ludowym, a jej prozdrowotne właściwości znalazły swoje odbicie przez umieszczenie kory kaliny jako surowca farmakopealnego w Farmakopei Polskiej III w roku 1954. Także owoce znajdują zastosowanie w przetwórstwie spożywczym w Turcji, Kanadzie, Rosji, na Ukrainie i w krajach skandynawskich. Wśród wielu aspektów leczniczych kaliny koralowej wymienia się między innymi działanie rozkurczowe, wzmacniające naczynia krwionośne, przeciwzapalne. Przyjmuje się, że składniki bioaktywne tej rośliny to związki flawonoidowe, triterpeny, kumaryny, fenolokwasy i inne, które jednak w kalinie koralowej nie były dotychczas szczególnie zidentyfikowane. W tę lukę bardzo dobrze wpisuje się przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Dominiki Kajszcak. Podstawową przesłanką do podjęcia badań była ocena możliwości wykorzystania części morfologicznych kaliny koralowej jako źródła składników



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

UNIwersytet PRZYRODNICZY WE WROCLAWIU
KATEDRA TECHNOLOGII OWOCÓW, WARZYW I NUTRACEUTYKÓW ROŚLINNYCH
ul. J. Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław
tel. 71 320-77-22
e-mail: anna.sokol-letowska@upwr.edu.pl



prozdrowotnych o właściwościach przeciwcukrzycowych, przeciwotyłościowych i przeciwutleniających. Badania zaprezentowane w dysertacji były finansowane w ramach projektu NCBiR: „Nowy program studiów doktoranckich na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej” współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego” POWR.03.02.00-00-I023/16 Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój, oraz przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu OPUS 2016/23/B/NZ9/03629. Wyniki były przedstawione na czterech konferencjach naukowych oraz w sześciu publikacjach o wysokim współczynniku IF (23,489), co potwierdza, że temat badań podjęty przez Doktorantkę dobrze wpisuje się w poszukiwania prozdrowotnych surowców i substancji do zastosowania w leczeniu cukrzycy, otyłości i innych schorzeń metabolicznych i jest ważny zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

2. Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Kajszczyk jest opracowaniem zawierającym ponad 200 stron tekstu, w tym 54 tabele i 46 rysunków, które w większości zostały odpowiednio przywołane w tekście. Zostały one starannie przygotowane i dobrze uzupełniają treść ocenianej pracy. Układ pracy i podział na rozdziały jest typowy dla opracowań o charakterze eksperymentalnym. Przedstawione w dysertacji wyniki badań mają bardzo szeroki zakres i poza rozwiązaniem głównego problemu badawczego zawierają również obszerną część dotyczącą sposobu ekstrakcji i frakcjonowania ekstraktów o wysokich aktywnościach prozdrowotnych.

Wstęp, w którym przedstawiono uzasadnienie wyboru tematyki pracy liczy 28 stron, i został podzielony przez Autorkę na dziewięć podrozdziałów. Następnie na dwóch stronach przedstawiono uzasadnienie wyboru tematu, **hipotezę badawczą oraz cele** pracy. Charakterystykę **materiału** badawczego i zastosowane **metody** badawcze zamieszczono na 33 stronach. **Omówienie wyników i dyskusję** przedstawiono w dwóch odrębnych rozdziałach, które łącznie zajmują 105 stron i zakończone są dziesięcioma wnioskami. Wyniki swoich eksperymentów Pani Dominika Kajszczyk omówiła w jedenastu podrozdziałach charakteryzując w sześciu z nich pierwotne i wtórne metabolity oraz aktywność antyoksydacyjną kwiatów, kory i owoców kaliny koralowej oraz otrzymane ekstrakty, a w kolejnych pięciu właściwości przeciwcukrzycowe i przeciwotyłościowe wybranych ekstraktów wraz z symulowanym trawieniem skrobi i oleju rzepakowego w roztworach modelowych. Przedstawione dane uzupełnione są o wyniki analizy statystycznej. Każdy z podrozdziałów kończy krótkie podsumowanie, które porządkuje informacje w kontekście wyznaczonych celów pracy. Dyskusja wyników została przeprowadzona w formie zwartej tekstu, w którym Doktorantka odnosi się do wykonanych badań i literatury przedmiotu. W dysertacji zacytowano 287 pozycji literaturowych, z których prawie 40% to, dotyczące tematu rozprawy



publikacje, wydane w ciągu ostatnich 5 lat. Tak obszerny wykaz literatury jest wystarczający dla poprawnego opracowania i dyskusji wyników badań.

Przy opracowaniu tak obszernych treści trudno jest uniknąć pewnych nieścisłości. W pracy pojawia się pewna ilość błędów literowych i stylistycznych. Na przykład: „chloregonic acid” na str. 13: „Kaliny składają się z ponad 230 gatunków” na str. 15: "kwasu galusowego na 100 gram świeżych owoców" na str. 24 - powinno być "ekwiwalentu kwasu galusowego" lub "w przeliczeniu na kwas galusowy". Niewłaściwe zastosowanie skrótu "tj", który, według słownika skrótów PWN oznacza "to jest", a użyty został wielokrotnie jako "takich jak", jak na przykład w zdaniu "Prozdrowotne działanie kaliny koralowej wynika z obecności związków bioaktywnych, tj. związki fenolowe, witamina C, karotenoidy, irydoidy oraz olejki eteryczne." na str. 28. Autorka w jednym akapicie podaje zawartości związków fenolowych w przeliczeniu na 1g lub 100 g świeżej lub suchej masy (np. na str. 24) - taki sposób jest mylący dla czytelnika i podczas przygotowania publikacji powinien zostać ujednolicony. Inne przykłady błędów stylistycznych to: "Z drugiej strony wykazano, że wzrost Gram-dodatnich bakterii kwasu mlekowego, t.j. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii* i *Lactobacillus plantarum*, które są korzystne dla zdrowia człowieka i zasiedlają przewód pokarmowy, były odporne na działanie składników owoców kaliny koralowej -str 40; Badania in vivo przeprowadzone na szczurach rasy Sprague Dawley z endometriozą, wywołaną autoprzeszczepieniem tkanki macicznej, leczono ekstraktami z suszonych owoców w dawce 100 mg/kg przez 28 dni. Użycie liczby pojedynczej gram zamiast gramów w wielu miejscach.

Dla porządku należy dodać, że kolejność omawianych zagadnień powinna pokrywać się z kolejnością zamieszczonych tabel (np. tabele 25-27 omawiane są w kolejności 27-26-25, podobnie tabele 31-33 omówiono w kolejności 31,33,32 oraz tabele 36-38 omówiono w kolejności 38, 37,36). Występują także pomyłki w nazwiskach autorów - na przykład pozycja 157 literatury: Moskalets i in. jest cytowana jako Moscaletes (str. 22) lub Moskaletes i in. Pozycja spisu Literatury nr 215: Skryptnik jest cytowana na str. 159 jako Skryptnik itp. Jedna pozycja literatury (poz.58. Engström i in. 2015) nie została zacytowana. Zabrakło także formalnego uporządkowania literatury w cytowaniach w tekście pracy - albo alfabetycznego albo według roku publikacji. Moim zdaniem tytuł podrozdziału 4.8 (Aktywność przeciwcukrzycowa oczyszczonego ekstraktu z owoców kaliny koralowej) powinien zostać skorygowany, ponieważ pokrywa się częściowo z tytułem rozdziału 4.7 (Aktywność przeciwcukrzycowa ekstraktów z kwiatów, kory i owoców kaliny koralowej), w którym są przedstawione również wyniki dotyczące ekstraktów oczyszczonych .

Są to jednak uchybienia, które zawsze pojawiają się w dużych opracowaniach, i które nie wpływają na wartość merytoryczną dysertacji. Przedstawiona praca jest spójna i kompletna, zawiera wszystkie niezbędne części przedstawione we właściwej kolejności i odpowiednich proporcjach.



3. Ocena merytoryczna

Jako cel pracy Autorka postawiła sobie ocenę możliwości wykorzystania części morfologicznych kaliny koralowej jako źródła składników prozdrowotnych o właściwościach przeciwcukrzycowych, przeciwotyłościowych i przeciwutleniających. Cel pracy został doprecyzowany przez podanie dziewięciu celów szczegółowych. Doktorantka zrealizowała je poprzez charakterystykę ilościową i jakościową metabolitów pierwotnych i wtórnych w suszonych kwiatach, korze i owocach kaliny koralowej oraz ekstraktach wodnych, etanolowych i acetonowych. Właściwości prozdrowotne określiła poprzez zastosowanie adekwatnych metod spektrofotometrycznych, chromatograficznych, i w układach modelowych z wykorzystaniem enzymów oraz symulowanego trawienia. Konsekwentna realizacja założonych celów pracy pozwoliła na potwierdzenie postawionej hipotezy badawczej.

W przeglądzie literatury, stanowiącym **wstęp** dysertacji, Pani mgr Dominika Kajszcak przedstawiła charakterystykę kaliny koralowej, jej składniki i potencjalne właściwości prozdrowotne. Jest to spójne tematycznie opracowanie stanowiące przegląd dotychczasowych badań, dokonane na podstawie bogatego piśmiennictwa zebranego przez Panią Magister.

Rozdział dotyczący **materiału badawczego i metod** badań to szczegółowe przedstawienie doświadczeń i wykorzystanych metod oznaczeń. Jako materiału badawczego użyto suszonych owoców, kwiatów i kory kaliny koralowej zakupionych w sklepach internetowych. Proszę o wyjaśnienie, czy na wstępnym etapie badań porównano produkty innych producentów w celu wybrania produktu najbardziej wartościowego i dlaczego nie podjęto próby samodzielnego zebrania materiału badawczego z plantacji lub stanu dzikiego. To umożliwiłoby wysuszenie surowca w kontrolowanych warunkach ograniczających straty składników prozdrowotnych. Zakup gotowych produktów suszonych wiąże się z brakiem możliwości określenia warunków suszenia materiału roślinnego przez wytwórców i tym samym z możliwością odmiennej jakości (stopień degradacji składników bioaktywnych) surowca pochodzącego z różnych źródeł.

Metody przygotowania ekstraktów i prowadzonych analiz opisano szczegółowo. Pewne niejasności występują w opisie przygotowania etanolowych i acetonowych ekstraktów surowych, nie jest bowiem wyjaśnione czy do powtórnej ekstrakcji użyto nowej porcji rozpuszczalników i w jakiej ilości (str 51). Podobnie przy opisie oznaczania zawartości błonnika nie podano czasu prowadzenia hydrolizy kwasowej. Autorka dysertacji w swoich badaniach zastosowała około 40 różnych metod analitycznych do określenia składu materiału badawczego oraz określenia jego właściwości prozdrowotnych. Wykorzystanie tak wielu metod analitycznych, niektórych o wysokim stopniu złożoności, do oznaczeń ilościowych i jakościowych świadczy o doskonałym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę. Pozwala też na przybliżenie i ocenę, jak dużą ilość wyników badań należało opracować, a następnie zaprezentować w dysertacji. Dobór metod umożliwił zrealizowanie zaplanowanego celu pracy. W tej części opracowania zabrakło mi jednak opisu lub schematu organizacji doświadczeń oraz informacji o powiązaniach poszczególnych części badań, co



niewątpliwie ułatwiłoby czytelnikowi poruszanie się w zagadnieniach tak obszernej pracy i podniosło jej przejrzystość. Podczas analizy pracy nasunęło mi się jednak pytanie dlaczego, mając do dyspozycji system chromatograficzny UPLC, Doktorantka zdecydowała się na metody wymagające większej ilości czasu i odczynników, a jednocześnie obarczone mniejszą pewnością wyników, takie jak oznaczenia polifenoli ogółem metodą Folina-Ciocalteu, oznaczenia proantocyjanidyn w układzie butanol/kwas solny, flawanoli metodą wanilinową czy flawonoidów z chlorkiem glinu.

Jak wskazuje Doktorantka, ważnym składnikiem mającym wpływ na właściwości kaliny są związki fenolowe. Zostały one oznaczone metodami spektrofotometrycznymi i chromatograficznymi, w tym metodą spektrometrii mas, a ich identyfikacja przedstawiona w rozdziale **Wyniki**. Z identyfikacją związków występujących w ekstraktach z owoców, kory i kwiatów kaliny koralowej Doktorantka doskonale poradziła sobie w częściach pracy odnoszącej się do charakterystyki tych ekstraktów (tabela 22 i 29 i rysunki 14 i 17). W ocenie pozostałych własności ekstraktów z kaliny koralowej Pani Magister wykorzystując metody enzymatyczne określiła wartości IC50 oraz parametry kinetyczne reakcji hamowania aktywności enzymów i powstawania produktów glikacji białek. Ważnym elementem pracy było zbadanie zdolności do obniżania strawności skrobi i tłuszczu poprzez inhibicję aktywności enzymów rozkładających cukry i tłuszcze w warunkach symulowanego trawienia w roztworach modelowych. Po raz pierwszy określono inhibicyjne działanie fitozwiązków kory i kwiatów kaliny koralowej wobec α -amylazy i α -glukozydazy, co niewątpliwie przyczyniło się do poszerzenia wiedzy w zakresie problematyki badanej przez Panią mgr inż. Dominikę Kajszczyk.

W **dyskusji** Doktorantka sprawnie skonfrontowała otrzymane wyniki własne z literaturą przedmiotu, uwypuklając aspekty pozwalające na otrzymanie odpowiedzi na postawioną w pracy hipotezę. Po wnikliwej analizie treści mam jednak pewne uwagi krytyczne. Część informacji zawartych w Dyskusji jest trudna do odnalezienia w rozdziale Wyniki, w celu analizy dyskutowanych treści. Uważam, że zabrakło w dyskusji wyraźnego podziału na części odnoszące się do postawionych w pracy celów oraz konsekwencji w kolejności ich omawiania w rozdziałach Wyniki i Dyskusja, co sprawiło, że analiza tekstu w tak zwartej formie jest dość kłopotliwa, a część informacji się powtarza. Ponadto sposób narracji nie zawsze czytelnie wskazuje na to, czy Autorka opisuje wyniki własne czy powołuje się na prace innych badaczy.

Autorka dysertacji słusznie zauważa, że znalezienie nowych, naturalnych inhibitorów enzymów lub receptorów biorących udział w rozwoju cukrzycy typu drugiego i otyłości może przyczynić się do opracowania nowych leków przeciwko temu schorzeniu. Interesującym aspektem pracy było więc zbadanie potencjalnej możliwości zmniejszenia dawki akarbozy i orlistatu poprzez wykorzystanie ekstraktów z owoców. Równie ciekawe było określenie aktywności związanych z hamowaniem tworzenia końcowych produktów glikacji białek. Wyniki tych badań wydają się mieć spory potencjał aplikacyjny. W tym miejscu nasuwa się pytanie jak użyte w eksperymentach stężenia związków



bioaktywnych mają się do możliwych do osiągnięcia w organizmie. Proszę również o wyjaśnienie, czy według wiedzy Doktorantki kalina koralowa zawiera substancje, które mogą działać niekorzystnie na organizm ludzki i czy posiada cechy, które mogłyby ograniczyć jej wykorzystanie.

Wnioski przedstawione na zakończenie pracy odnoszą się do postawionej hipotezy badawczej i założonych celów badań. W moim odczuciu, w świetle uzyskanych wyników pewien niedosyt wywołało u mnie słabe podkreślenie we wnioskach faktu, że oczyszczony ekstrakt acetonowy z owoców charakteryzował się zdolnością hamowania powstawania końcowych zaawansowanych produktów glikacji białek (AGE) przewyższając pod tym względem kwas chlorogenowy i aminoguanidynę, co stwarza potencjalne możliwości jego wykorzystania.

4. Uwagi końcowe

Rozprawa doktorska magister inżynier Dominiki Kajszczak pod tytułem: „Bioaktywne związki kaliny koralowej i ich potencjał prozdrowotny” jest interesującym i oryginalnym opracowaniem o dużym potencjale aplikacyjnym. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do opracowania preparatów wspomagających leczenie cukrzycy i otyłości. Przedstawione powyżej uwagi krytyczne i elementy dyskusyjne nie obniżają wartości merytorycznej pracy, a jedynie mają służyć doskonaleniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę.

5. Wniosek

Po szczegółowym zapoznaniu się z treścią przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wymagania stawiane pracom na stopień doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia oraz formalne wymagania określone w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule z Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003r (Dz.U. nr 65, poz 595) z późniejszymi zmianami (Dz.U/z 2017r, poz 1789). **Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Dominiki Kajszczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Anna Sokół-Łętowska