

prof. dr hab. inż. Maciej Balawejder

Rzeszów 23.11.2021

Instytut Technologii Żywności i Żywienia

Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. **Kamila Szymczaka**

pt. „BIOAKTYWNE SKŁADNIKI OWOCÓW WYBRANYCH DAWNYCH
ODMIAN JABŁONI”

Podstawą formalną przygotowania niniejszej recenzji jest Uchwała Nr 60/2021 Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej z dnia 6 lipca 2021 r. oraz pismo Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ dr hab. inż. Anny Diowkszy, prof. uczelni z dnia 5 października 2021 r.

Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego

Polska jest jednym z największych na świecie producentów jabłek. Obecnie w produkcji używane są odmiany, których cechy są dostosowane do wymagań rynku. Hoduje się odmiany typowo przemysłowe, dające duży plon owoców wykorzystywany do przetwórstwa oraz konsumpcyjne o wysokich walorach organoleptycznych. Szczególnie cenione są owoce o atrakcyjnym wyglądzie. W dobie zaostrzonych regulacji dotyczących użycia środków ochrony roślin selekcjonowane są odmiany o dużej odporności na choroby, w tym te przechwalnicze. Cechy te nie zawsze idą w parze ze smakiem czy zapachem owoców, które w owocach konsumpcyjnych są najważniejsze.

Wśród producentów materiału szkółkarskiego, którego duże ilości produkcji się w okolicach Dębicy na Podkarpaciu, zauważalny jest trend oferowania dawnych odmian jabłoni, szczepionych na podkładkach o pożądanym walorach produkcyjnych. Związane jest to ze wzmożonym zainteresowaniem sadowników, którzy zgodnie z zapotrzebowaniem rynku chcą

produkować owoce odmian znanych ze staropolskich sadów, ale w sposób dostosowany do wymogów nowoczesnej agrotechniki. W świetle tych faktów uważam temat recenzowanej dysertacji za bardzo aktualny i ważny. Dodatkowym argumentem przemawiającym za prowadzeniem tego typu badań jest fakt, że cechy organoleptyczne dawnych odmian jabłek są znane i cenione, natomiast wiedza o zawartości związków bioaktywnych w tych owocach jest mała.

Formalna ocena pracy

Opiniowana praca przygotowana jest w klasycznym układzie z podziałem na rozdziały i podrozdziały. Całość opracowania obejmuje 170 stron, w tym 32 rysunki, 89 (!) tabel. Jak przyjęto w opracowaniach naukowych tego typu dysertacja rozpoczyna się od syntetycznego wstępu, a następnie Autor prezentuje przegląd aktualnej literatury tematu. Rozdział ten liczy 21 stron. Następnie przedstawiono część eksperymentalną (24 strony), badania własne (102 strony) oraz podsumowanie i wnioski. W dysertacji zamieszczono adekwatny spis literatury oraz dorobek naukowy doktoranta.

Podsumowując dysertacja spełnia formalne wymagania stawiane tego typu opracowaniom.

Merytoryczna ocena pracy

Autor w pierwszym podrozdziale przedstawia czytelnikowi wprowadzenie, które pozwala zrozumieć wagę podjętego problemu badawczego. Pokazuje w jakim kierunku zmierza hodowla odmian jabłek i dlaczego poszukuje się owoców odmian dawnych. Na końcu wstępu, lakonicznie definiuje cel pracy stwierdzając, że o jabłkach wiadomo mało, szczególnie o zawartości w nich związków bioaktywnych.

W dalszej części dysertacji Doktorant przedstawia systematykę i pochodzenie jabłoni. Widoczny tu jest Jego ogromny wkład pracy i zaangażowanie w badania literaturowe. Cytuje opracowania z całej dostępnej literatury, łącznie z opracowaniami starożytnych autorów takich jak Pliniusz Starszy. Analizuje również produkcję jabłek, wskazując mocną pozycję Polski jako producenta o ugruntowanej światowej pozycji. Ważnym podrozdziałem pracy jest „Prozdrowotne właściwości jabłek”. Można w nim znaleźć informacje o grupach związków chemicznych, które są obecne w jabłkach, jak również o ich wpływie na organizmy żywe. Doktorant pokazuje, że bogaty skład tych owoców ma również inny wymiar. Stwierdza, że pomimo swoich bardzo cennych prozdrowotnych właściwości, jabłka mogą mieć negatywny wpływ na ludzkie zdrowie, powodując alergie pokarmowe czy możliwość zatruc występującą

w pestkach jabłek amigdalina. W dalszej części przedstawia organiczne związki lotne, których obecność w jabłkach ma wpływ na właściwości organoleptyczne owoców. Definiuje również podstawowe czynniki determinujące odczuwalny smak, a przede wszystkim substancje wpływające na słodkość tych owoców. Jeden z ważniejszych podrozdziałów dysertacji zawiera informacje o możliwościach pomiaru aktywności biologicznej żywności. W technologii żywności najwyższy nacisk kładziony jest na pomiar wartości odżywczej żywności, jednak w obecnym czasie równie ważnym jest wykazanie, że żywność wykazuje także aktywność biologiczną. Ta część dysertacji pozwala czytelnikowi zrozumieć definiowany w dalszych rozdziałach problem badawczy i prezentowane wyniki analiz. Cytowana literatura jest aktualna i w sposób prawidłowy wyselekcjonowana, dlatego oceniam tą część pracy doktorskiej mgr inż. Kamila Szymczaka bardzo wysoko.

Następnie Autor płynnie przechodzi do prezentowania części eksperymentalnej. Rozdział ten rozpoczyna się od podania dokładnych opisów czynności laboratoryjnych, które są wyjątkowo skrupulatnie opisane. Jest to niezwykle ważne w pracach eksperymentalnych, w których podstawową wartością jest ich odtwarzalność. Szczególną uwagę zwraca zastosowana metodyka oznaczania związków fenolowych, kwasów triterpenowych i cukrów, których analiza wymagała, oprócz izolacji z matrycy, skomplikowanego procesu derywacji poprzedzającego właściwą analizę. Niestandardową dla dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia częścią prac badawczych było wykorzystanie linii komórkowych do oceny aktywności biologicznej ekstraktów pozyskanych z materiału badawczego. Dalej standardowo zdefiniowano materiał badawczy oraz zastosowane odczynniki chemiczne. Tą część dysertacji również oceniam wysoko z uwagi na rzetelność jej przygotowania.

W kolejnych rozdziałach Autor obszernie prezentuje wyniki wykonanych badań. We wstępie do tej części pracy tłumaczy schemat czasowy doświadczenia i wyniki z przyczyn od Niego nie zależnych problemy z dostępnością materiału badawczego. Pozwala to zrozumieć czytelnikowi sposób postępowania w procesie badawczym oraz tłumaczy różnice w składzie odmianowym jabłek badanych w poszczególnych latach. Kolejne podrozdziały w sposób klarowny pokazują wkład pracy doktoranta w opracowanie technik analitycznych oraz prezentują wyniki analiz chemicznych. Prezentacja ta rozpoczyna się od przedstawienia wyników analizy profilu związków lotnych. Autor oparł metodykę analityczną na pracach zespołu prof. J. Pawliszyna ale ze znacznymi swoimi modyfikacjami. Prace te pozwoliły porównać profil związków lotnych w badanych odmianach jabłek. Następnie przedstawiono wyniki oceny sensorycznej. W sposób jasny Doktorant zaprezentował jak jabłka przechowywał

przed analizą i jak kształtowały się ich właściwości organoleptyczne. W trakcie prac badano również zawartość alergenów w owocach. Testy te wykazały znaczną zmienność zawartości badanych alergenów w obrębie analizowanych odmian oraz zmienność sezonową, ale co ciekawe z wyraźną tendencją rosnących zawartości alergenów w dawnych odmianach w porównaniu do odmianach nowych.

Wiele pracy Doktorant poświęcił na opracowanie uniwersalnych metod ekstrakcji związków ze skórek i miąższu jabłek. W wyniku tych prac zaproponowano procedurę pozwalającą pozyskiwać ekstrakt z zadawalającą wydajnością oraz zawierający najwyższe ilości związków bioaktywnych kształtujących potencjał antyoksydacyjny, zawartość i profil polifenoli, związków fenolowych, kwasów triterpenowych. Ekstrakty te poddano szeregowi analiz chemicznych a szczególną uwagę czytelnika zwraca stopień skomplikowania zastosowanych chromatograficznych procedur analitycznych. Metody te (GC-MS) również z sukcesem zastosowano do analizy zawartości cukrów w owocach.

Oznaczony ciekawy skład związków bioaktywnych w owocach odmian Kantówka Gdańska oraz Grochówka uzasadnia przeprowadzanie dalszych badań aktywności biologicznej ich metanolowych ekstraktów. Ekstrakty te zostały odpowiednio zateżone i wymieszane z medium hodowlanym. W początkowej fazie badań określono potencjał cytotoksyczny ekstraktów wobec komórek linii HepG2 i Caco-2. W celu szerszego zbadania potencjału cytotoksycznego preparatów, przeprowadzono analogiczne badania dla innych dwóch linii komórkowych: komórek zawieszinowych ludzkiej białaczki limfocytarnej HL60 oraz mysich komórek makrofagów RAW 264.7. Doktorant postawił tezę, że stężenia ekstraktu z Kantówki Gdańskiej pomiędzy IC_0 a IC_{50} , które mają potencjał cytotoksyczny, indukują śmierć komórek typu apoptotycznego w komórkach HepG2 i Caco-2. Tezę tą potwierdziły przeprowadzone badania. Badano również działanie cytoprotekcyjne metodą pomiaru aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem znacznika H₂DCFDA, który w utlenionej na skutek działania rodników formie DCF wykazuje się fluorescencją. Jako kontrole pozytywną testu zastosowano znany, chemiczny induktor stresu oksydacyjnego, tert-BOOH, który generował wzrost poziomu wolnych rodników w komórkach. Wykazano, że dla preparatów (ekstraktów) w stężeniach niecytotoksycznych wyższy potencjał do zmniejszania wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych rodników wykazywał ekstrakt ze skórek odmiany Grochówka przez znaczną redukcję stresu oksydacyjnego. Ekstrakt z Kantówki Gdańskiej wykazywał działanie słabsze o kilka procent w porównaniu do ekstraktu z Grochówki. Najsilniejsze działanie redukujące poziom ROS zaobserwowano wobec komórek enterocytów Caco-2, zaś najmniejsze wobec

komórek hepatomy HepG2. Zastosowanie badanych ekstraktów miało wpływ na poziom enzymatycznych markerów stresu oksydacyjnego dysmutazę ponadtlenkową (ang. sodium dysmutase, SOD) czy peroksydazę glutationową (ang. glutathione peroxidase, GPx) oznaczanych w liniach komórkowych. Ponieważ silniejsze działanie preparatów w zakresie zmniejszenia poziomu ROS zaobserwowano dla komórek Caco-2, dlatego też zbadano wpływ ekstraktów na aktywność ww. enzymów. Co ciekawe ekstrakty zwiększyły aktywność SOD ale nie miały wpływu na działanie GPx.

W ostatnim etapie Doktorat dokonał rozległego posumowania przeprowadzonych badań. Analiza tego podrozdziału wskazuje, że uzyskane wyniki są komplementarne a na ich podstawie można sformułować wnioski. Jedynym zarzutem jaki można postawić do całości opracowania jest to, że w żadnej części pracy nie sformułowano hipotezy badawczej, którą by poddano weryfikacji. Zazwyczaj w ostatnim rozdziale czytelnik uzyskuje odpowiedź czy hipoteza została potwierdzona czy nie. Wprawdzie cel pracy jest zdefiniowany tj. czy owoce dawnych odmian jabłoni rzeczywiście charakteryzują się wysokimi zawartościami wybranych bioaktywnych związków oraz, czy pod względem walorów konsumpcyjnych mogą konkurować z najpopularniejszymi obecnie odmianami, to ze względu małą ilość badanych czynników odpowiedź nie jest łatwa.

Rozprawa napisana jest poprawnie i jej przyjęcie nie budzi wątpliwości, ale prosiłbym Autora o ustosunkowanie się do następujących uwag:

1. Dlaczego do analiz aktywności biologicznej użyto metanolowych roztworów ekstraktów? Czy metanol jako trucizna nie zaburzał wyników pomiaru z użyciem linii komórkowych?
2. Jakie przełożenie mają wykonane badania aktywności ekstraktów z wykorzystaniem linii komórkowych na potencjalne efekty konsumpcji jabłek dawnych odmian? Cytując Doktoranta „Co ważniejsze z punktu widzenia konsumentów, dla stężeń niecytotoksycznych (0,1 mg/ml) preparaty wykazywały wysoki potencjał do zmniejszania wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych rodników (ROS). Z tego co zrozumiałem, testowano ekstrakty, należy więc zadać pytanie czy działanie owoców będzie takie samo?

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić także uwagę na pojawiające się w pracy błędy literowe, stylistyczne oraz interpunkcyjne. Szczególnie zwraca uwagę niewłaściwe użycie separatorów dziesiętnych w wielu tabelach. W Polsce obowiązującym separatorem jest

przecinek a nie kropka, która obowiązuje głównie w krajach anglosaskich. Proszę o uważną redakcję tekstów przyszłych publikacji, które zapewne powstaną na podstawie dysertacji. Należy zaznaczyć, że błędy te nie są liczne i rażące oraz nie wpływają na wysoką ocenę dysertacji. W zamiarze recenzenta odpowiedź na te pytania oraz uwagi zawarte w recenzji, pozwolą w sposób bardziej usystematyzowany opublikować cenne wyniki zawarte w tej dysertacji i nie umniejszają jej wartości.

Wniosek końcowy

Pan mgr inż. Kamil Szymczak zapoznał się z literaturą przedmiotu badań i na tej postawie poprawnie sformułował jej cel. W sposób usystematyzowany przeprowadził zaproponowane eksperymenty oraz logicznie przedstawił i zinterpretował ich wyniki. Przygotowując ocenianą dysertację wykazał wysokie predyspozycje do pracy naukowej i niezwykłą dojrzałość. Wskazać należy również, że wyniki zawarte w dysertacji mają nie tylko wysoką wartość poznawczą, ale również użyteczną.

W mojej opinii przedstawiona do oceny praca pt. „Bioaktywne składniki owoców wybranych dawnych odmian jabłoni” spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom będącym postawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Wnioskuje do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Pana mgr inż. Kamila Szymczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Górska

prof. dr hab. inż. Maciej Balawejder

Rzeszów 23.11.2021

Instytut Technologii Żywności i Żywienia

Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego

Dr hab. inż. Anna Diowks, prof. uczelni

Dziekan Wydziału Biotechnologii

i Nauk o Żywności PŁ

Szanowna Pani Dziekan,

w związku z przedstawieniem do recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Kamila Szymczaka pt. „Bioaktywne składniki owoców wybranych dawnych odmian jabłoni” wnioskuję, za pośrednictwem Pani Dziekan, do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie tej dysertacji. Rozprawa ta oprócz wysokiej wartości naukowej jest również cennym opracowaniem o charakterze użytkowym. Zakres przeprowadzanych prac badawczych jest ponadprzeciętnie szeroki a na szczególną uwagę zasługują badania przeprowadzone z użyciem linii komórkowych.

Z wyrazami szacunku,

Maciej Balawejder

