

Skierniewice, 31 października 2024 r.

Dr hab. inż. Monika Mieszczakowska-Frać, prof. IO
Zakład Przechowalnictwa
i Przetwórstwa Owoców i Warzyw
Instytut Ogrodnictwa – PIB
Skierniewice

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Hejduk

pt. „**Badania przemian i właściwości biologicznych elagotanin roślin z rodziny *Rosaceae***”

wykonanej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności w Łodzi
w Instytucie Technologii i Analizy Żywności,
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Roberta Klewickiego,
i drugiego promotora dr hab. inż. Michała Sójki

Recenzja przygotowana na podstawie Uchwały Rady do Spraw Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej z dnia 18 czerwca 2024 r.

Uzasadnienie dla wyboru tematyki badań

Wśród gatunków owoców dojrzewających w umiarkowanej strefie klimatycznej, owoce jagodowe uważa się za najbardziej wartościowe jeśli chodzi o źródło różnorodnych związków o działaniu przeciwutleniającym. Większość owoców jagodowych cieszy się dużym uznaniem wśród konsumentów i są chętnie spożywane w stanie świeżym. Jednak owoce jagodowe są surowcem o niskiej trwałości przechowalniczej w związku z czym są również wykorzystywane do produkcji przetworów. Co z jednej strony wydłuża możliwość ich spożycia, a z drugiej strony wiąże się z utratą ich prozdrowotnych składników, które w dużej mierze zatrzymywane są w odpadach poprodukcyjnych. Wiele badań donosi, iż duże skoncentrowanie składników prozdrowotnych w owocach jagodowych przypada na skórkę owoców, która często pozostaje w produktach odpadowych, np. typu wytlóki, młóto. Mając na uwadze fakt, że Polska jest największym producentem owoców jagodowych w Europie, istotnym dla polskiej gospodarki jest pokazanie kierunków zagospodarowania odpadów powstających podczas przetwarzania owoców jagodowych. Zaproponowany przez Autorkę sposób wykorzystania odpadów z przetwarzania maliny, jeżyny, truskawki i poziomki do

wytwarzania ekstraktów elagotanin stanowi bardzo interesujące rozwiązanie. Co więcej Autorka nie tylko skupiła się na metodzie ekstrakcji elagotanin ale również zgłębiła wiedzę odnośnie przemian elagotanin rozpatrując szeroką gamę zmiennych warunków jakie mogą wpłynąć na wartość biologiczną ekstraktów, co umożliwia wskazanie ich właściwego wykorzystania.

Tym samym wybór tematu rozprawy doktorskiej postrzegam jako celowy, a równocześnie jako bardzo ambitny, a uzyskane wyniki wskazują na wysoką wartość aplikacyjną pracy.

Konstrukcja pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę monografii o strukturze typowej dla dysertacji opartych na danych eksperymentalnych. Tytuł pracy jest zgodny z przedstawionym zakresem prac badawczych, chociaż zdaniem recenzenta w tytule można było ograniczyć się do rodzaju *Rubus* i *Fragaria*, a nie do rodziny *Rosaceae*, która jest bardzo liczną rodziną botaniczną. Praca została przygotowana w formie bardzo obszernego maszynopisu i liczy 276 stron. Właściwa część pracy składa się z 9 rozdziałów, po rozdziałach 'Wprowadzenie' i 'Przegląd piśmiennictwa' następuje część artykułująca 'Cel i zakres pracy'. Kolejny rozdział 'Materiały i metody' przedstawia zastosowane metody analityczne oraz zapoznaje czytelnika z zakresem i sposobem przeprowadzonych prac eksperymentalnych. Omówienie wyników zostało połączone z dyskusją w jeden rozdział, co w tak obszernym opracowaniu było właściwym podejściem. W kolejnym rozdziale „Podsumowanie” autorka przedstawiła najważniejsze osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych eksperymentów, przechodząc następnie do rozdziału „Wnioski”. Właściwa część pracy uzupełniona została rozdziałami: „Spis treści” „Streszczenie” w języku polskim i angielskim oraz „Spis Publikacji”. W pracy zamieszczono 80 rysunków oraz 39 tabel. Praca posiada aktualną i odpowiadającą omawianym i analizowanym zagadnieniom bibliografię liczącą 387 pozycji, praktycznie wszystkie anglojęzyczne. Przy czym jedna pozycja Sachett i in., 2021 pojawiła się 2-krotnie, natomiast w spisie brakuje wspomnianych w maszynopisie dwóch pozycji: (1) Spiro i Pui–Lang, 1995; (2) Torun i in., 2015. Znaczna część pozycji opublikowane w ostatnich 10 latach w czasopismach o wysokiej randze naukowej, chociaż Doktorantka sięgała również po dużo starsze pozycje literaturowe.

Praca została przygotowana starannie w sposób uporządkowany i czytelny oraz kompletny odpowiadając wymogom formalnym stawianym opracowaniom monograficznym.

Ocena merytoryczna

Rozprawa ma charakter wielowątkowy i interdyscyplinarny i została zaplanowana jako sekwencja celowych działań, które miały doprowadzić do poznania właściwości elagotanin i ich przemian w zależności od ich budowy, jak również środowiska w jakim się znajdują dążąc do wskazania właściwej ich aplikacji.

Rozdział „Przegląd piśmiennictwa” został zredagowany poprawnie, w sposób zwięzły, poruszający wszystkie przydatne informacje do prowadzenia eksperymentów, co dowodzi pełnego zrozumienia Doktorantki w wybranej tematyce badawczej.

Doktorantka najpierw zapoznała czytelnika z charakterystyką owoców jagodowych oraz ich znaczeniem, a następnie w sposób bardzo czytelny wprowadziła do tematyki elagotanin od ich charakterystyki po istotne przemiany jakim ulegają, przechodząc do metod ich wyodrębniania. Autorka szeroko opisała właściwości prozdrowotne, przeciwdrobnoustrojowe elagotanin oraz ich biodostępność i interakcje z wybranymi składnikami żywności, a w szczególności z białkami. Doktorantka analizując dostępną literaturę doszła do wniosku iż w literaturze nadal brak informacji o właściwościach i przemianach elagotanin w zależności od ich stopnia oczyszczenia oraz źródła pochodzenia, co umożliwiło sformułowanie długiej listy celów szczegółowych.

Pierwszy zakres badań polegał na eksperymentach dających odpowiedź na temat transferu elagotanin w trakcie przetwarzania owoców malin, jeżyn, truskawki i poziomki, jak również określenie kinetyki ekstrakcji elagotanin z wycieków, opracowanie metody otrzymywania ekstraktów o różnym stopniu oczyszczenia i ich scharakteryzowanie. Drugi Etap wyodrębniony przez Doktorantkę skupiał się na określeniu stabilności elagotanin w nieklarowanych sokach i przecierach. Tutaj nasuwa się pytanie „Dlaczego zdecydowano się na przechowywanie przetworów w temperaturze -20 °C?” Zarówno soki jak i przeciery są produktami, których komercyjnie nie przechowuje się w takich warunkach. Badania stabilności prowadzono także na liofilizowanych ekstraktach elagotanin w różnych warunkach temperatury, z dostępem światła i bez, działaniem promieniowania UV-C, w warunkach zróżnicowanego pH, jak również w obecności zróżnicowanego stopnia

nasycenia tlenem. Tak rozbudowane eksperymenty świadczą o dużej dociekliwości i dojrzałości naukowej Doktorantki. Aż w końcu ostatni obszar badań mający na celu poznanie zjawiska związania elagotanin z białkami oraz ich przemian w symulowanym układzie pokarmowym *in vitro*. Na szczególną pochwałę zasługuje Doktoranta za fakt nie ograniczenia się w tych badaniach do roztworów modelowych białek, ale również przeprowadzenie badań na rzeczywistej matrycy wysokobiałkowej jakim jest mięso, co miało znamiona badań aplikacyjnych. Szeroki już zakres badawczy był dodatkowo uzupełniony o analizę właściwości biologicznych ekstraktów o najwyższym stopniu oczyszczenia w stosunku do 15 patogenów zanieczyszczających żywność. Doktorantka wykazała antybakteryjne działanie wszystkich badanych ekstraktów w stosunku do bakterii *Listeria* spp., *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. i *Staphylococcus* spp., wskazując na wyższe strefy zahamowania dla elagotanin wysokocząsteczkowych oraz dla ekstraktów z surowca z rodzaju *Rubus* niż *Fragaria*.

Rozdział „Materiały i Metodyka” składający się z 5 podrozdziałów jest ułożony w sposób logiczny opisując po kolei materiał, odczynniki, metody analityczne, operacje i procesy technologiczne oraz opis analizy statystycznej. Przyjęta metodologia badań jest logiczna i prawidłowo dobrana, i w pełni pozwala na weryfikacje założonych zagadnień. Pomimo widocznej staranności Autorki do klarownego i czytelnego opisanie wielowątkowej metodyki nie uchroniła się jednak przed pewnymi drobnymi błędami i uchybieniami.

- na str. 44 „Materiał do badań stanowiły 4 owoce jagodowe rodziny *Rosaceae*” – powinno być ...4 **gatunki** owoców jagodowych rodziny *Rosaceae*.

- Jednym z celów pracy było określenie kinetyki 2-stopniowej **ekstrakcji acetonowej elagotanin** z wycieków badanych owoców jagodowych (str. 42). Przechodząc do metodyki (rozd. 4.3.1 **Ekstrakcja acetonowa elagotanin**) czytelnik dowiaduje się o ekstrakcji z zastosowanie **ultradźwięków** przeprowadzonej w **3 etapach**. Przechodząc dalej do rozdz. 4.4.3.1 **Przygotowanie ekstraktu surowego** – czytelnik dowiaduje się o ekstrakcji prowadzonej w dwóch analogicznych krokach – domyślając się, że to jest „ta” **2-stopniowa ekstrakcja acetonowa**, o której mowa w celu rozprawy. Wyodrębnienie rozdziału 4.3.1 wprowadziło zamieszanie i ten rozdział powinien być składową rozdziału **Oznaczenie ilościowe i jakościowe polifenoli** (4.3.2).

- brak informacji w ilu powtórzeniach wykonano ekstrakcję w celu przeprowadzenia oznaczeń ilościowych i jakościowych polifenoli.
- czy ekstrakcja do oznaczeń antocyjanów jest taka sama jak dla elagotanin? Brak tej informacji w rozdz. 4.3.2.2
- czy do zahamowania reakcji floroglucynolizy dodano 0,6 ml wodnego roztworu octanu sodu do całej objętości r-ru reakcyjnego? Czy raczej w stosunku 1:1 (0,6 ml do 0,6 ml)?
- w rozdz. 4.3.3 „Oznaczanie potencjału antyoksydacyjnego” uwzględniono analizę TPC (total phenolic compounds) jako miarę potencjału antyoksydacyjnego z czym nie mogę się do końca zgodzić, ponieważ TPC świadczy o zawartości związków, które wykazują właściwości antyoksydacyjne, i które to można mierzyć np. metodą DPPH czy FRAP. Nawet wyniki prezentowane w dysertacji (Tab. 34), potwierdzają, że TPC nie jest miarą aktywności przeciwutleniającej.
- w opisie produkcji sków i przecierów (rozdz. 4.4.1) brak informacji o ilości powtórzeń technologicznych. W jaki sposób mierzono temperaturę podczas pasteryzacji w mikrofalówce?
- na str. 63. Autorka odnosi się do rozdziału 4.3.6, którego nie ma w opracowaniu. To samo dotyczy się odwołania do rozdz. 4.4.6.2 na str. 69
- rys. 17 str. 72 – ten schemat posiada niespójności jeśli chodzi o dawki ekstraktów w porównaniu z opisami jakie są w rozdziałach 4.4.9.2.2, w którym np. Doktoranta pisze, że do produktów mięsnych dodawano stałą dawkę w ilości 1%, zaś na rys. 17 jest informacja 0,25-1%. Jak również widoczne są niespójności w stosunku do Tab. 33 w odniesieniu do ilości peklosoli w kiełbasach białych.
- Część dotycząca opisu metod statystycznych jest opisana w sposób bardzo oszczędny, np. nie zawiera informacji o ilości powtórzeń.

Pomimo, powyższych uwag dotyczących rozdziału „Materiały i Metody” na szczególną pochwałę zasługuje Doktorantka za przygotowanie uproszczonych schematów (rys. 14, 15, 16 i 17), które ułatwiły prześledzenie i zrozumienie rozbudowanej metodyki. Na uznanie zasługuje otwartość Doktorantki w wykorzystywaniu najnowszych metod analitycznych i kompilowanie ich z metodami uznawanymi już za klasyczne w celu pozyskiwania nowej wiedzy.

Uzyskane wyniki przedstawiono i przedyskutowano w rozdziale liczącym 170 stron w układzie odpowiadającym przeprowadzonym doświadczeniom. Każdy z podrozdziałów zawierał krótki wstęp uzasadniający podjęcie tematyki lub przypomnienie przeprowadzonego eksperymentu, co czyniło rozdział bardziej czytelnym. Sposób zaprezentowania wyników w postaci tabel i wykresów był bardzo przejrzysty, chociaż momentami występowały niespójności w opisach umieszczonych na wykresach i pod wykresami. Ponadto, stosowane były często skrótowe opisy rzędnych i odciętych, co w przypadku stosowania osi pomocniczych powodowało wykres nieczytelny. Wiele niejasności posiada Rys. 74. Czy wykres zatytułowany 'Ekstrakcja' dotyczy mięsa surowego? Czy to są średnie wyniki dla wszystkich wariantów produktów mięsnych? Wkradały się również chochliki edytorskie np. w opisie Tab. 6 „± odchylenie standardowe”, czy zwrot „litera rzymska” w Tab. 7., lub brak oznaczeń statystycznych. Z drugiej zaś strony sposób przedstawienia przemian elagotanin podczas 24 godzinnej inkubacji w różnych pH (rys 55 i 60) zasługuje na szczególną pochwałę.

Zauważono nieścisłości w wyliczeniu udziału Lambertianiny C i Sanguiny H-6 w sumie ETs+EAC w rozdz. 5.2.1 i 5.2.3 w porównaniu do danych umieszczonych, odpowiednio w Tab.3 i Tab. 5. Skąd to wynika?

W rozdziale 5.3.5 sformułowało błędne spostrzeżenie iż, w przypadku ekstraktów truskawkowych uzyskanych z wytlóków po produkcji soków osiągnięto znacznie wyższe wartości FRAP i DPPH w porównaniu do ekstraktów pozyskanymi z wytlóków po produkcji przecierów, co nie jest zgodne z danymi przedstawionymi na Rys 28.

Jak na rys. 75 wyjaśnić oznaczenia literowe nad słupkami dla ciecierzycy i soczewicy, skoro na wykresie są wyodrębnione jako osobne pojedyncze produkty, a opis pod wykresem mówi, że statystyka została wykonana w obrębie danego produktu między sposobem obróbki/dodatku?

Niezależnie od pewnych potknięć i nieścisłości w prezentacji uzyskanych wyników, ich jakość naukową oceniam bardzo wysoko. Szczególna pochwała należy się Doktorantce za każdorazowe szukanie naukowych wyjaśnień wszelkich zaobserwowanych trendów, co świadczy o dużej dociekliwości naukowej. Uzyskane wyniki stanowią bardzo cenne uzupełnienie i rozszerzenie obecnej wiedzy na temat elagotanin pochodzących z owoców rodzaju *Rubus* i *Fragaria*. Przedstawione zostały przemiany tych związków w zależności od

matrycy w jakiej się znajdują jak również udowodniono istotność warunków zróżnicowanego pH i temperatury na stabilność tych związków. Badania dowiodły, że stopień związania elagotanin przez białka zależy od matrycy jak również stopnia oczyszczenia elagotanin. Ponadto, Doktorantka wskazała żelatynę i gluten jako białka najsilniej wiążące elagotaniny. Za ogromną wartość przeprowadzonych badań uznaję wykonanie badań stabilności kompleksów żelatynowo-elagotaninowych w warunkach odpowiadających układowi trawiennemu.

Jak wynika z informacji umieszczonej przez Doktorantkę na końcu opracowania, część wyników będących przedmiotem niniejszej rozprawy zostało wykorzystane do przygotowania kilku publikacji, które ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

W pracy sformułowano w sposób poprawny 14 wniosków, z których moim zdaniem wnioski 4 - 8 poszerzają wiedzę na temat właściwości biologicznych elagotanin i wpływie czynników zewnętrznych na te właściwości. Natomiast wnioski 9, 10, 12, 13 mają duże znaczenie praktyczne. Wyodrębnione wnioski są z pewnością potwierdzeniem wysokiego potencjału ekstraktów bogatych w elagotanin, a możliwość wytworzenia ich z produktu odpadowego jest niesłychanie istotne w świetle gospodarki o obiegu zamkniętym. Uważam, że użyteczny charakter otrzymanych wniosków zachęca do szukania kolejnych sposobów zastosowania ekstraktów elagotanin, nie tylko w produktach mięsnych jak zaproponowała w dysertacji Doktorantka.

Podsumowanie

Przedstawioną rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Przytoczone w recenzji uwagi do poszczególnych rozdziałów w żaden sposób nie umniejszają jej wartości naukowej, jak również wartości praktycznej przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Niewątpliwie za sukces należy przyznać opracowanie metodyki pozwalającej na otrzymanie skoncentrowanych ekstraktów bogatych w elagotaniny z bioodpadów co umożliwiło Doktorantce przeprowadzenie szeregu wnikliwych badań i pozwoliło na kompleksowe podejście do tematyki. Ponadto, Doktorantka zrealizowała w pełni swój ambitny cel pokazując możliwości wykorzystania wytworzonych ekstraktów jako naturalnych dodatków do żywności, co udowadnia dojrzałość badawczą Doktorantki.



Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Hejduk pod tytułem „Badania przemian i właściwości biologicznych elagotanin roślin z rodziny *Rosaceae*” w mojej ocenie spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Monika Miśszczakowska-Fajc

Skierniewice, 31 października 2024 r.

Dr hab. inż. Monika Mieszczakowska-Frać, prof. IO
Zakład Przechowalnictwa
i Przetwórstwa Owoców i Warzyw
Instytut Ogrodnictwa – PIB
Skierniewice

Rada Naukowa
Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Wnioskuje do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Hejduk pod tytułem „Badania przemian i właściwości biologicznych elagotanin roślin z rodziny *Rosaceae*” stosowną nagrodą. Uważam, że poziom merytoryczny pracy, imponujący zakres wykonanych eksperymentów oraz badań laboratoryjnych z zastosowaniem nowoczesnych technik analitycznych, doskonała dokumentacja i dyskusja uzyskanych wyników oraz bardzo wysoka wartość naukowa i aplikacyjna przeprowadzonych badań zasługuje na wyróżnienie.

Monika Mieszczakowska-Frać

