

Białystok, 6 maja 2019 r.

Prof. dr hab. Anatol Kojło
Uniwersytet w Białymstoku
Instytut Chemii
15-399 Białystok
ul. Hurtowa 1

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR PAULINY DRÓŻDŹ
pt. „BADANIE MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA PRODUKTÓW UBOCZNEGO
UŻYTKOWANIA LASU JAKO ŹRÓDŁA ANTYUTLENIACZY”

Rośliny są bogatym źródłem naturalnych antyutleniaczy, wśród których związki polifenolowe są bardzo liczną i zróżnicowaną pod względem budowy i właściwości grupą substancji organicznych. Są to związki neutralizujące reaktywne formy tlenu, chroniąc w ten sposób organizm człowieka przed stresem oksydacyjnym. Produkty ubocznego użytkowania lasu są jeszcze jednym źródłem tych ważnych ze względu na właściwości zdrowotne, odżywcze i lecznicze związków polifenolowych. Dlatego badanie wspomnianych produktów w tym kontekście jest bardzo istotne. Zajmuje się nimi w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej pt. „Badanie możliwości wykorzystania produktów ubocznego użytkowania lasu jako źródła antyutleniaczy” mgr Paulina Dróżdź, pracująca pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Krystyny Pyrzyńskiej.

Głównym celem badań przeprowadzonych przez dr Paulinę Dróżdź było oznaczenie właściwości antyutleniających ekstraktów uzyskanych z próbek wybranych produktów ubocznego użytkowania lasu pochodzenia roślinnego. Równorzędnym celem było określenie chemicznego składu tych produktów, głównie pod kątem obecności w nich związków polifenolowych odpowiedzialnych za te właściwości. Mgr P. Dróżdź wybrała do badań następujące uboczne użytki leśne: wrzos zwyczajny, borówkę czernicę, borówkę brusznicę, korę sosny pospolitej oraz korę dębu. *W tym miejscu nasuwa się oczywiste pytanie, dlaczego akurat ten zestaw użytków leśnych został wybrany, jakie były kryteria wyboru.*

Układ rozprawy jest zgodny z ogólnie przyjętymi standardami, a praca została przygotowana starannie, skonstruowana logicznie i napisana przejrzysto. Rozprawa liczy 162 strony, zawiera 26 tabel, 46 rysunków oraz 228 odnośników literaturowych. Zawiera

streszczenie w języku polskim i angielskim oraz dane o dotychczasowym dorobku naukowym doktorantki.

We wprowadzeniu doktorantka definiuje przedmiot swoich badań – produkty ubocznego użytkowania lasu oraz wskazuje na korzyści wynikające z ich pozyskiwania. W części literaturowej w rozdziałach 1 - 3 omawia kolejno badane produkty pod względem ich morfologii, biologii i zastosowań. W dalszej kolejności analizuje skład chemiczny tych produktów zwracając szczególną uwagę na zawartość w nich związków polifenolowych, form w jakich występują, czynników od których zależy ich zawartość i wskazuje na prozdrowotne właściwości tych produktów. W następnym, rozdziale 4, omawia główne klasy związków polifenolowych (kwasy fenolowe, flawonoidy i antocyjany) ich budowę i właściwości. Analizuje problemy związane z procedurami ekstrakcyjnymi pozwalającymi na wydzielenie polifenoli z próbek naturalnych. Przytacza szereg literaturowych przykładów ekstrakcji związków polifenolowych z produktów badanych przez siebie (wrzosa, borówka, kory dębu i sosny). Ważnym problemem, który także porusza w tym rozdziale jest analiza chromatograficzna związków polifenolowych. W tym miejscu krytycznie omawia możliwości zastosowania w tym celu różnych rodzajów chromatografii i różnych detektorów. Ostatnim tematem części literaturowej są właściwości antyutleniające związków polifenolowych i metody ich badania. W tym miejscu zwięźle omawia mechanizmy reakcji będących podstawą tych metod (HAT – przeniesienie atomu wodoru, SET – przeniesienie pojedynczego elektronu) oraz kilka wybranych metod, w tym zastosowanych na potrzeby recenzowanej pracy (metody: Folina-Ciocalteu, DPPH i CUPRAC). *Należy jednak pamiętać, że zastosowanie metod chemicznych do oznaczania aktywności antyutleniającej badanych ekstraktów nie odzwierciedla rzeczywistej aktywności zawartych w nich związków polifenolowych, w żywym organizmie.* Układ treści omawianych w części literaturowej i dobór źródeł uważam za trafny i dobrze korespondujący z podjętymi problemami badawczymi.

Badania własne mgr Paulina Drózdź opisała w sposób bardzo czytelny w rozdziałach 5 – 8. W rozdziale 5 wymienia odczynniki stosowane w badaniach oraz wykorzystywaną w nich aparaturę. Opisuje badane próbki, miejsce ich poboru, metodykę ich pobierania oraz stosowane w badaniach procedury ekstrakcji z nich związków polifenolowych. W dalszej kolejności omawia wszystkie procedury wykorzystywane w badaniach ekstraktów: rozdzielanie chromatograficzne w trybie RP oraz HILIC, oznaczanie całkowitej zawartości flawonoidów oraz antocyjanów, oszacowanie właściwości antyutleniających metodami FC,

CUPRAC i DPPH, oznaczenie zawartości makro i mikroelementów. W każdym z trzech kolejnych rozdziałów (6 – 8) mgr Paulina Dróżdź przedstawia, dla kolejnych produktów, wyniki badań charakteryzujących je pod względem składu, zawartości związków polifenolowych oraz mikro i makroelementów oraz właściwości antyutleniających ich ekstraktów.

W badaniach wstępnych doktorantka dokonała wyboru rozpuszczalników stosowanych do ekstrakcji związków fenolowych z próbek badanych produktów. Wybrała cztery rozpuszczalniki: wodę, 100% etanol, 60% etanol oraz octan etylu (*domyślam się, że na podstawie danych literaturowych – przydałoby się głębsze uzasadnienie wyboru tych właśnie rozpuszczalników*). Wstępne badania dotyczące efektywności ekstrakcji doktorantka przeprowadziła dla próbek kwiatów wrzosów, określając efektywność ekstrakcji kwasu chlorogenowego oraz kwercetyny przy użyciu etanolu oraz mieszaniny etanolu z wodą (60/40 v/v). Zbadała kinetykę tego procesu i określiła optymalny jego czas na 20 min. Zdecydowała także, że będzie badała ten proces w dwóch temperaturach (20 i 55°C), mając na uwadze wzrost efektywności ekstrakcji wraz ze wzrostem temperatury oraz niebezpieczeństwo rozkładu związków polifenolowych w zbyt wysokiej temperaturze. *Domyślam się, że w tych badaniach zawartość kwasu chlorogenowego oraz kwercetyny oznaczano chromatograficznie. Dlaczego do tych badań wybrano właśnie te dwa związki, przecież inne mogą charakteryzować się inną kinetyką procesu ekstrakcji? Jakim parametrem charakteryzowano efektywność ekstrakcji?*

W dalszej kolejności Doktorantka badała ekstrakty poszczególnych produktów w podobny sposób. Przeprowadzała analizę chromatograficzną ekstraktów na zawartość kwasów fenolowych i flawonoidów stosując dwa tryby postępowania: RP (chromatografia w układzie faz odwróconych) oraz HILIC (chromatografia oddziaływań hydrofilowych). *Z opisu wynika, że w przypadku ekstraktów z kwiatów wrzosów zastosowany został tryb RP, a w przypadku ekstraktów z borówki tryb HILIC. Jakie kryterium zastosowano przy wyborze trybów analizy chromatograficznej. Jaki tryb zastosowano w analizie chromatograficznej kory sosny oraz dębu? Czy warunki zastosowane w analizie chromatograficznej zaczerpnięto z literatury, czy też optymalizowano je na potrzeby niniejszej rozprawy?* Na podstawie przeprowadzonej analizy chromatograficznej doktorantka zidentyfikowała obecne w ekstraktach związki fenolowe, ich zawartość w µg/g (*na g ekstraktu czy na g próbki?*) i proporcje między nimi. W ekstraktach z kwiatów wrzosów wykazała po raz pierwszy obecność trectinu, flawonoidu o silnych właściwościach antyutleniających. Dla pełniejszej charakterystyki badanych produktów doktorantka oznaczyła w ekstraktach całkowitą zawartość

flawonoidów wyrażoną w μmol ach katechiny/g (na podstawie pomiaru absorbancji ich kompleksów z jonami Al^{3+}) oraz antocyjanów wyrażoną w mg chlorku cyjanidyno-3-glukozydu/g (na podstawie różnicy absorbancji roztworu próbki mierzonej przy dwóch różnych wartościach pH). W przypadku owoców borówek oraz kor sosny i dębu oznaczyła także zawartość makro i mikroelementów (zbadala zawartość 13 pierwiastków), stosując (po mineralizacji) metodę atomowej spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-OES).

Najistotniejszym problemem badawczym rozprawy było określenie właściwości antyutleniających ekstraktów badanych produktów w kontekście możliwości wykorzystania ich jako źródła antyutleniaczy. W tym miejscu doktorantka zastosowała znane i często stosowane w tym celu metody spektrofotometryczne. Pierwszą z nich była metoda Folina-Ciocalteu (FC) oparta na pomiarze absorbancji barwnego kompleksu powstającego w wyniku redukcji przez antyutleniacze soli heteropolikwasów fosforowolframolibdenowych w środowisku alkalicznym. Metodą tą wyznacza się raczej zdolność redukującą badanej próbki, bowiem na sygnał analityczny wpływają także inne związki obecne w próbce, a nie będące polifenolami. Wyniki otrzymane metodą FC zostały wyrażone w przeliczeniu na zawartość kwasu galusowego (mg kwasu galusowego/g próbki). Drugą metodą, także wyznaczającą właściwości redukujące, była spektrofotometryczna metoda CUPRAC oparta na redukcji kompleksu Cu(II) z neokuproiną (wyniki zostały wyrażone w przeliczeniu na zawartość troloksu w mmol/L). Trzecia metoda zastosowana w tym celu wykorzystuje zdolność antyutleniaczy do neutralizacji rodnika DPPH*. W tym przypadku wyniki przedstawione zostały jako procent neutralizacji tego rodnika w stosunku do jego początkowego stężenia. Wyniki oznaczeń zdolności redukujących i antyutleniających badanych ekstraktów doktorantka analizowała między innymi ze względu na miejsce poboru próbek, rodzaj użytego ekstrahenta, rodzaj związków fenolowych zawartych w tych ekstraktach czy też ze względu na gatunek wrzosu, borówki czy rodzaj kory. Porównywała także wyniki otrzymane w swoich badaniach z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy dla roślin rosnących w innych regionach świata. W przypadku badania właściwości antyutleniających borówki uzyskała dobrą korelację między wynikami uzyskanymi metodami FC i CUPRAC (podała w tym przypadku wartość R^2). *Czy takie korelacje były także wyznaczone w przypadku oznaczonej właściwości antyutleniających ekstraktów kwiatów wrzosów oraz kory dębu i sosny? Może warto byłoby także wyznaczyć korelacje między wynikami uzyskanymi metodami FC i CUPRAC a metodą DPPH?*

Każdy z rozdziałów 6 – 8 opisujących badania przeprowadzone dla próbek kolejnych ubocznych użytków leśnych kończy ich podsumowaniem i przedstawieniem wynikających z nich wniosków. *Brakuje natomiast, moim zdaniem, końcowego całościowego podsumowania opisanych w rozprawie badań z przedstawieniem końcowych uogólnionych wniosków i wyraźnym zaakcentowaniem elementów nowości naukowej.*

Rozprawa jest napisana w zasadzie poprawnie pod względem językowym. Pojawiają się jedynie nieliczne niezręczne sformułowania, czasem żargonowe określenia, także kilka „literówek”. Analizując opisane w niej badania mogę stwierdzić, że zostały one logicznie uzasadnione i dobrze zaplanowane oraz wykonane i opisane z należytą starannością. Są dobrze udokumentowane licznymi wykresami i wynikami zestawionymi w tabelach. Zastosowanie nowoczesnych technik analitycznych i sprawdzonych, w tego typu badaniach, metod analitycznych daje gwarancję dobrej jakości naukowej przeprowadzonych badań. Zakres opisanych w pracy zagadnień i badań oraz sposób ich przedstawienia i omówienia świadczą o ogromnej pracowitości Doktorantki, Jej dobrym rozeznaniu literaturowym oraz samodzielności w formułowaniu i rozwiązywaniu problemów badawczych. Wyniki badań opisanych w rozprawie zostały już opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych, co również świadczy o wartości i ważności podjętych przez mgr Paulinę Drózdź prac eksperymentalnych. Należy również zauważyć istotny już, jak na ten etap rozwoju naukowego, dorobek naukowy mgr Pauliny Drózdź w postaci współautorstwa ośmiu publikacji, pięciu rozdziałów w monografiach i szeregu wystąpień konferencyjnych.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Drózdź spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. Ustaw Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wobec tego wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anatol Woźniak