

Lublin, 14.02.2017

Prof. dr hab. Barbara Baraniak
Katedra Biochemii i Chemii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marcina Turemko pt. „Aktywność przeciwutleniająca związków polifenolowych w badaniach modelowych ze szczególnym uwzględnieniem metod elektrochemicznych” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Danuty Zielińskiej prof. UWM w Katedrze Chemii Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w sprawie powołania recenzentów w związku z postępowaniem wszczętym w celu nadania stopnia naukowego doktora mgr inż. Marcinowi Turemko i przekazaną pismem Dziekana Wydziału Nauki o Żywności – prof. dr hab. Małgorzaty Darewicz z dnia 15.12.2016 roku.

Przedmiotem recenzji jest dysertacja doktorska dotycząca oznaczania właściwości przeciwutleniających związków fenolowych, która została wykonana w ramach projektu badawczego NCN nr 5056/B/PO1/2011/40 pt. „Badanie aktywności przeciwutleniających roślinnych związków polifenolowych – aplikacja metod elektrochemicznych w eksperymentalnym modelu *in vitro*” realizowanym w latach 2011-2014. W latach 2012-2013 mgr inż. Marcin Turemko pobierał stypendium w ramach projektu „Dr INNO 3. Stypendia doktoranckie” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Na przestrzeni ostatnich lat na szeroką skalę prowadzone są badania aktywności fizjologicznej składników żywności, w tym metabolitów wtórnych żywności pochodzenia roślinnego, a przede wszystkim związków fenolowych. Najwięcej prac dotyczy ich właściwości przeciwutleniających, ponieważ powszechnie uważa się, że stres oksydacyjny jest przyczyną wielu schorzeń w tym tzw. chorób cywilizacyjnych.

Działanie przeciwutleniaczy determinowane jest przede wszystkim ich strukturą chemiczną, a w metodach badania aktywności przeciwutleniającej wykorzystywane są różnorodne mechanizmy przebiegu reakcji. Badane są zdolności do neutralizowania wolnych rodników zarówno występujących w układach biologicznych jak i syntetycznych, zdolności do chelatowania i redukcji jonów metali czy zdolności do przeniesienia elektronu z przeciwutleniacza na materiał elektrody. Prowadzone są prace nad oceną stosowanych procedur, co pozwoli na standaryzację stosowanych rozpuszczalników i warunków wykonywania pomiarów, jak również nad poszukiwaniem nowych rozwiązań stanowiących alternatywne możliwości wykonywania pomiarów zdolności przeciwutleniających. Zaliczane są do nich metody elektrochemiczne, które stanowią tematykę dysertacji doktorskiej mgr inż. Marcina Turemko.

Dysertacja doktorska obejmuje 219 stron tekstu, w tym 25 tabel (4 w załączniku) i 103 rysunki (51 w załączniku). Autor podał 201 pozycji literatury związanej z zagadnieniem, na ogół obcojęzycznej (21 pozycji w języku polskim) a jej większość, bo 66,17% to prace opublikowane na przestrzeni ostatnich 10 lat.

Praca składa się z ośmiu ponumerowanych rozdziałów, poprzedzonych spisem treści i streszczeniem w języku polskim i angielskim. Ostatnie trzy rozdziały stanowią wnioski, literatura (raczej powinno być wykaz literatury) i załączniki. Brakuje natomiast wykazu stosowanych skrótów. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich (wstęp, zagadnienie w świetle literatury, cel pracy, materiały i metody, omówienie wyników i dyskusja, wnioski). Szczegółowy spis treści umożliwia szybkie odnalezienie odpowiedniego fragmentu pracy.

W przeglądzie literatury określonej jako „Zagadnienie w świetle literatury” obejmującym 51 stron, Autor omawia proces powstawania i znaczenie reaktywnych form tlenu, syntetyczne i naturalne przeciwutleniacze ze szczególnym uwzględnieniem związków fenolowych (ich budowy, aktywności oraz zależności pomiędzy strukturą a potencjałem przeciwutleniającym).

Przedstawione zostały także metody stosowane w badaniach aktywności przeciwutleniającej w oparciu o mechanizmy działania, oraz związki biologicznie aktywne występujące w jabłkach. Przegląd literatury dobrze świadczy o znajomości piśmiennictwa i zagadnień związanych z realizacją tematu dysertacji, brakuje jednak podrozdziału związanego z katabolizmem w organizmie człowieka związków fenolowych dostarczanych z pokarmem. Treści napisane są logicznie i na ogół poprawnie stylistycznie i gramatycznie, chociaż Autor nie uniknął stosowania potocznych określeń takich jak: doniesienia, trendy, opieranie się na czy śledzenie.

Niesformułowana hipoteza badawcza pracy zakłada, że do wyznaczania aktywności przeciwutleniających związków fenolowych mogą być stosowane metody elektrochemiczne. W celu określenia zależności pomiędzy właściwościami elektrochemicznymi wybranych związków fenolowych z ich aktywnością przeciwutleniającą mierzoną powszechnie stosowanymi metodami spektrofotometrycznymi mgr inż. Marcin Turemko wykorzystał cykliczną woltamperometrię (CV) i różnicową woltamperometrię pulsową (CPV) oraz oznaczył zdolność do redukcji jonów żelaza (III), zdolność do neutralizowania wolnych rodników 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) oraz zdolność do chelatowania jonów żelaza (II) w układach o różnych wartościach pH. Pomiary zostały dokonane dla standardów związków fenolowych i dla związków fenolowych wyizolowanych z jabłek.

W rozdziale „Materiały i metody” mgr inż. Marcin Turemko podaje wykorzystane w badaniach odczynniki, aparaturę i sprzęt laboratoryjny, opisuje materiał badawczy i sposób jego przygotowania, skład układów pomiarowych, stosowane w pracy metody i techniki analityczne. Rozdział ten obejmuje 25 stron i stanowi logiczny opis dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych badań a także dowodzi doboru właściwych metod do rozwiązania postawionych celów pracy.

Otrzymane wyniki zostały przedstawione w rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja” obejmującym 64 strony oraz na 30-stu stronach w załączniku. Rozdział ten zawiera 5 podrozdziałów, w których kolejno omawiane są właściwości elektrochemiczne wzorcowych związków fenolowych z uwzględnieniem wpływu pH na potencjał ich utleniania, aktywność redukcyjna (określona potencjałem utleniania wyznaczonym z krzywych woltamperometrycznych CV i CVP oraz polem powierzchni pod anodową krzywą cyklicznego woltamperogramu), aktywność przeciwutleniająca związków fenolowych

oznaczona metodami spektrofotometrycznymi, zdolność do chelatowania jonów Fe(II). Ostatnią część rozdziału stanowią wyniki dotyczące analogicznych oznaczeń przeprowadzonych dla ekstraktów ze skórek i miąższu jabłek.

Oznaczenia przeprowadzono dla sześciu standardowych kwasów fenolowych (protokatechowego, wanilinowego, galusowego, kawowego, ferulowego i chlorogenowego); 29 flawonoidów w tym: 5 flawonów (apigenina i jej glukozyd, luteolina i jej dwa glukozydy); 9 flawonoli (kempferol i jego dwa glukozydy, kwercetyna i jej glukozydy, rutyna); 3 flawanony (naringenina i jej glukozyd, hesperedyna); 4 flawanole (katechina, epikatechina, epigalokatechina i jej galusan); 6 antocyjanów (cyjanidyna, delfinidyna, pelargonidyna i ich glukozydy); dwa chalkony (floretyna i florydzyzna) oraz trzynastu niskocząsteczkowych metabolitów – kwasu fenylooctowego i jego pięciu pochodnych (4 hydroksy – i jedna metoksy-hydroksy); pięciu pochodnych kwasu fenylopropionowego (hydroksy-, metoksy i estru metylowego); kwasu 4-hydrokylbenzoesowego i 1,3,5-trihydroksybenzenu. Jako związki referencyjne zastosowano Troloks, kwas L-askorbinowy oraz kwas moczowy.

Magister inż. Marcin Turemko na podstawie przebiegu krzywych woltamperometrycznych wykazał, że podobnie tak jak związki referencyjne, nieodwracalnemu utlenianiu ulegają związki fenolowe nie posiadające w swojej strukturze grupy di- lub trihydroksylowej lub posiadające grupę hydroksylową w pierścieniu B, a także te, u których jedna z grup katecholowych uległa metylacji lub glikozylacji. Struktura związków (obecność ugrupowań katecholowych lub galolowych) decyduje również o ich aktywności redukcyjnej do wyznaczenia której można wykorzystać zarówno potencjały utleniania wyznaczone z woltamperogramów (CV i DPV) jak i pola powierzchni pod krzywymi prądu anodowego cyklicznych woltamperogramów (AUC). Dużą aktywność redukcyjną wykazują związki o niskich wartościach potencjału utleniania i dużych wartościach pola powierzchni.

W celu porównania aktywności redukcyjnej oznaczonej metodami elektrochemicznymi z wartościami otrzymanymi metodami spektrofotometrycznymi (zdolność do redukcji jonów żelaza (III) – FRAP i zdolność do neutralizowania wolnych rodników DPPH) Doktorant wyraził wszystkie otrzymane wyniki w mM Troloksu, wykonując odpowiednie pomiary elektrochemiczne i krzywą wzorcową dla tego związku. Otrzymane dane potwierdziły przydatność proponowanych metod elektrochemicznych do badań zdolności przeciwutleniających związków fenolowych, przy czym wysoką dodatnią korelację otrzymanych wyników Doktorant uzyskał dla metody cyklicznej woltamperometrii (CV).

Otrzymane wyniki udowodniły, że zmierzone zdolności redukcyjne czy chelatujące związków fenolowych są uzależnione nie tylko od ich struktury chemicznej, rodzaju metody,

kwasowości układu pomiarowego ale także obecności innych związków chemicznych – pomimo pewnych wspólnych kierunków nie udało się uzyskać takiej samej kolejności związków po ustaleniu szeregu aktywności nawet w przypadku zastosowania badania zdolności redukcji jonów żelaza (III) w dwóch układach pomiarowych. Rozbieżności te były największe w przypadku określenia zdolności chelatujących.

Interesującą częścią przeprowadzonych badań są wykonane prace aplikacyjne związane z wykorzystaniem proponowanych metod elektrochemicznych w oznaczaniu właściwości przeciwutleniających żywności, którą w tym przypadku stanowiły ekstrakty otrzymane ze skórek i miąższu jedenastu odmian jabłek

Doktorant oznaczył w nich ogólną zawartość związków fenolowych i flawonoidów ogółem, dokonał jakościowo-ilościowej analizy związków fenolowych metodą HPLC-DAD-MS/MS, określił aktywność redukcyjną i zdolność do chelatowania jonów metali metodami spektrofotometrycznymi i elektrochemicznymi. Szkoda, że Autor dysponując licznymi wynikami nie podjął próby powiązania zawartości poszczególnych związków fenolowych (a nie tylko ich ogólnego poziomu) z otrzymanymi aktywnościami i postulowania ewentualnych interakcji w mieszaninie. Generalnie, połączenie przedstawienia wyników z ich dyskusją zużyło przeprowadzenie tej ostatniej, która zajęła w sumie ok. czterech stron i dotyczy głównie porównania otrzymanych wyników z osiągnięciami innych badaczy bez szczególnego poszukiwania przyczyn otrzymanych różnic czy podobieństw.

Do tej części pracy nasuwają się następujące uwagi i pytania:

- jakie było kryterium wyboru związków dla których wyniki przedstawiono w tekście pracy i w załączniku
- kolejność podrozdziałów 5.4.1 i 5.4.2 zgodnie z przyjętą konwencją powinna być zamieniona
- dlaczego analizując wpływ pH stosując metody spektrofotometryczne stosowano roztwory o pH 2,5, 6,8 i 7,7 a w metodzie elektrochemicznej pH roztworu wynosiło 6,0
- należało umieścić (przynajmniej w załączniku) krzywą wzorcową dla Troloksu, wykorzystywaną do obliczenia aktywności innych związków
- jakie było kryterium wyboru odmiany jabłek, dla których umieszczono cykliczne woltamperogramy i dlaczego pozostałych nie umieszczono w załączniku
- w tekście na str. 137 (ostatnie zdanie) nie powinno być „ekstraktów z jabłek”, które omawiane są w rozdziale 5.5 rozpoczynającym się od strony 154
- porównanie efektywności zastosowanych metod znacznie ułatwiłoby zestawienie w tabeli związków o najwyższych aktywnościach oznaczonych poszczególnymi metodami

- tekst omawiający wyniki zestawione na rysunkach czy w tabelach powinien znajdować się w bezpośrednim ich sąsiedztwie

Praca podsumowana jest dziewięcioma wnioskami, które znajdują odzwierciedlenie w otrzymanych wynikach, z zastrzeżeniem, że pierwszy wniosek powinien być ostatnim i zawierać potwierdzenie użyteczności metod elektrochemicznych do wyznaczenia właściwości przeciwutleniających związków fenolowych, z uwagi na fakt, że tego typu prace były prowadzone przez innych badaczy.

Brakuje także podania ograniczeń stosowanie metod elektrochemicznych w badaniach żywności o wyjaśnienie których proszę Doktoranta w trakcie publicznej obrony dysertacji.

Do wykazu literatury mam dwie uwagi: brak zaznaczenia w wykazie prac tych samych autorów z tego samego roku liter „a” i „b” oraz nie umieszczono w wykazie przywoływanych w tekście Roczników Branżowych Głównego Urzędu Statystycznego i Rozporządzenia Komisji UE. Należy podkreślić, że wszystkie umieszczone pozycje literaturowe są cytowane w tekście pracy.

Uwagi przedstawione w ocenie pracy mają charakter redakcyjny, część z nich dyskusyjny i nie mają wpływu na pozytywną ocenę merytoryczną pracy. Mgr inż. Marcin Turemko postawił sobie za cel istotny problem określenia zależności pomiędzy właściwościami elektrochemicznymi związków fenolowych a ich aktywnością przeciwutleniającą i zdolnością do chelatowania jonów metali. Uzyskane wyniki badań zarówno dla modelowych związków fenolowych jak i występujących w skórkach i mięszu jabłek potwierdziły przydatność metod elektrochemicznych (CV i DPV) do badania właściwości przeciwutleniających tych związków.

Tego typu badania są nowatorskie w zakresie analizy żywności w aspekcie oznaczania aktywności fizjologicznie czynnych składników żywności pochodzenia roślinnego. Badania zostały wykonane dużym nakładem pracy i inwencji twórczej, z wykorzystaniem nowoczesnych technik analitycznych.

Otrzymane w pracy rezultaty wnoszą duży ładunek poznawczy – wskazują na możliwości wykorzystania metod elektrochemicznych w ocenie właściwości przeciwutleniających związków fenolowych, które mogą zastępować lub uzupełniać stosowane metody spektrofotometryczne, co stanowi bardzo ważny przyczynek w procesie

zarówno oznaczania potencjału przeciwutleniającego żywności, jak również wyjaśniania mechanizmów przebiegu reakcji uzależnionych od warunków jej prowadzenia i budowy aktywnego związku.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi wartościową i oryginalną pracę badawczą z uwagi na ważną i użyteczną tematykę wnoszącą nowe kierunki do technologii żywności w zakresie analizy żywności, oraz zastosowanie w badaniach poprawnych i nowoczesnych metod analitycznych.

Reasumując uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Marcina Turemko pt. „Aktywność przeciwutleniająca związków polifenolowych w badaniach modelowych ze szczególnym uwzględnieniem metod elektrochemicznych” stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie naukowe, które spełnia wymagania stawiane pracom na stopień doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia oraz formalne i merytoryczne kryteria zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Barbara Baranich