

Olsztyn, 10.02.2017

Prof. dr hab. Ryszard Amarowicz

Zakład Chemicznych i Fizycznych Właściwości Żywności

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

***Recenzja rozprawy doktorskiej Pana magistra inżyniera Marcina Turemko pt.
„Aktywność przeciwutleniająca związków polifenolowych w badaniach modelowych
ze szczególnym uwzględnieniem metod elektrochemicznych”***

***Praca wykonana została w Katedrze Chemii Wydziału Kształtowania Środowiska i
Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego
pod kierunkiem dr hab. Danuty Zielińskiej, prof. UWM.***

Tematyka wolnych rodników i naturalnych przeciwutleniaczy ma charakter bardzo interdyscyplinarny. Zajmuje ona ważne miejsce nie tylko w obszarze chemii, medycyny i biologii, ale również w nauce o żywności. Poznanie mechanizmów utleniania ważnych składników odżywczych, zbadanie możliwości zapobiegania tym procesom poprzez zastosowanie syntetycznych i naturalnych przeciwutleniaczy oraz opracowywanie metod analizowania aktywności przeciwutleniającej biologicznie aktywnych składników żywności jest aktualnym wyzwaniem dla naukowców. Z dużą satysfakcją mogę stwierdzić, że oceniana praca doktorska wnosi istotne nowe treści odnoszące się do przeciwutleniaczy i metod oznaczania ich aktywności.

Przedstawiona do oceny praca doktorska obejmuje 219 stron druku. Jej treść została podzielona na *Wstęp*, *Zagadnienie w świetle literatury*, *Cel pracy*, *Materiał i metody*, *Omówienie wyników i dyskusję*, *Wnioski*, *Literaturę* i *Załączniki*.

Dokumentację w pracy stanowią 52 rysunki (+ 52 rysunki w *Załącznikach*) oraz 21 tabel. Rysunki zawarte w pracy przygotowane są w profesjonalny sposób. Ich szata graficzna jest bardzo dobra. Uzupełniają dobrze tekst i pozwalają lepiej go rozumieć.

Spis *Literatury* jest bardzo obszerny i obejmuje 201 pozycji różnorodnych, zaktualizowane do 2016. Dobór publikacji jest odpowiedni. Zdaniem recenzenta obejmuje wszystkie podstawowe publikacje odnoszące się do aktywności przeciwutleniającej naturalnych związków polifenolowych i metod ich analizy. Przy paginacji ciągłej czasopisma niepotrzebnie podawane są w kilkudziesięciu pozycjach numery zeszytów w roczniku. W pozycji 114 powinno być „... reakcji Maillarda ...”; w pozycji 123 „2,6-Di-*tert*-butyl-hydroxytoluene...”; w pozycji 199 w tytule pracy powinny być małe litery.

We *Wstępie* Doktorant przedstawia podstawowe informacje dotyczące reaktywnych form tlenu, roli wolnych rodników w inicjowaniu chorób cywilizacyjnych, przeciwutleniaczy syntetycznych i pochodzenia naturalnego, własności przeciwutleniających kwasów fenolowych i flawonoidów, wpływu struktury w/w związków na ich właściwości przeciwutleniające. Następnie Doktorant omawia trendy w badaniach aktywności przeciwutleniającej związków fenolowych oraz w badaniach pojemności przeciwutleniającej. Uwzględnia metody wykorzystujące mechanizm SET, HAT, metody elektrochemiczne oraz inne metody analityczne. Końcowy fragment tej części dysertacji odnosi się do związków biologicznie aktywnych jako naturalnych związków przeciwutleniających oraz do jabłek jako źródła związków biologicznie aktywnych.

Wstęp w wyczerpujący sposób informuje o problemie badawczym podjętym przez Doktoranta, o jego praktycznym i poznawczym znaczeniu. Dobór piśmiennictwa

nie budzi wątpliwości. Styl tej części pracy jest bardzo dobry. We *Wstępie* Doktorant nie ustrzegł się pewnych błędów merytorycznych i językowych:

Str. 11 – Nieodpowiedni styl: „...naturalne przeciwutleniacze ...dostarczanez produktami żywnościowymi bogatymi w związki polifenolowe...”.

Str. 11 - Nieodpowiedni styl: „... są nierozłącznymi składnikami naszej diety”.

Str. 15 – Apoptoza w komórkach nowotworowych jest zjawiskiem korzystnym.

W kilku przypadkach Doktorant powinien odwołać się do artykułów źródłowych zamiast sięgać do podręcznika akademickiego.

Str. 18 - Trudno się zgodzić z przypisaniem przeciwutleniaczom tak szerokiego spektrum działania.

Str. 18 – Jak przeciwutleniacze mogą wspomagać proces powstawania wolnych rodników?

Str. 18 – Nieodpowiedni styl: „ surowce roślinne bogate w związki fitochemiczne”.

Str. 19 – Powinno być „systemy kontroli” zamiast „władze państw”.

Str. 20 – Powinno być „tłuszczów zwierzęcych”.

Str. 21 –Czy rzeczywiście związki fenolowe mogą akumulować się w organizmie?

Str. 22 – Glutation nie jest białkiem.

Str. 23 – Należało wymienić rzepak jako źródło sinapiny.

Str. 27 – Trudno taniny zaliczyć do flawanoli. Stanowią one odrębną grupę związków polifenolowych.

Str. 34 – Wydaje się, że homeostazę zapewniają w organizmie raczej wyspecjalizowane białka.

Str. 38 – Cytowane prace mają głównie charakter opracowań przeglądowych.

Str. 40 – Poprawna cytowalność:” Niki i współpracownicy [2010]”.

Str. 42 – Jako TEAC wyraża się jednak głównie wyniki testu ABTS.

Str. 43 – „GC/DAD”?

Str. 46 i inne miejsca – Zdaniem recenzenta poprawną formą jest „kationorodnik ABTS” zamiast kationorodnik ABTS⁺.

Str. 46 i inne miejsca pracy – Powinno być „Trolox”. Przy odmianie poprawna jest rzeczywiście forma „Troloksu”.

Str. 47 – Należało zaznaczyć, że większość modyfikacji metody DPPH uwzględnia stały czas reakcji i ilość przeciwutleniacza potrzebną do redukcji rodnika o 50%.

Str. 48 – Wydaje się, że należało wymienić bardzo popularną metodę „reducing power” wykorzystującej tworzenie się błękitu pruskiego (Oyaizu, M. (1878). Studies on products of browning reaction–Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315).

Str. 58 – Witaminy zalicza się do składników odżywczych.

Str. 59/60 – Należało wspomnieć również o peptydach.

Wskazane byłoby omówienie aktywności przeciwutleniającej wyznaczonej poprzez pomiar zmian zachodzących w olejach i tłuszczach w badaniach modelowych z dodatkiem naturalnych przeciwutleniaczy („bulk oil system” „meat model system”).

Str. 61 – Powinno być „0,4 g lipidów bogatych w WNKT”.

Str. 63 – Zdaniem recenzenta należało w paragrafie uwzględnić mętne soki jabłkowe.

Wychodząc z treści zawartych we *Wstępie* Doktorant formułuje bardzo poprawnie cel Swojej pracy (str. 64). Na wyróżnienie zasługuje tu antycypacja korzyści poznawczych i praktycznych, które będą wynikać z realizacji założonych celów.

W rozdziale 4 *Materiał i metody* Doktorant zamieszcza najpierw wykaz odczynników, aparatury i sprzętu laboratoryjnego. W tym miejscu pragnę uwagę na nowoczesny charakter instrumentarium analitycznego użytego do realizacji celów badawczych w niniejszej pracy.

W dalszej części rozdziału podana jest lista związków fenolowych, związków referencyjnych, buforów i materiały roślinnego – jabłek jedenastu odmian pochodzących z lokalnego rynku w województwie warmińsko-mazurskim. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo szeroki zakres związków chemicznych. Obejmuje on 5 związków referencyjnych, kwasy fenolowe (6 związków) oraz flawonoidy: flawony (5 związków), flawonole (9 związków), flawony (3 związki), flawanole (4 związki), antocyjany (6 związków), chalkony (2 związki). Doktorant zestaw analizowanych związków fenolowych poszerzył o 13 głównych metabolitów flawonoidów. Wszystkie związki charakteryzowały się wysokim stopniem czystości.

Do oznaczenia aktywności przeciwutleniającej czystych związków fenolowych oraz ekstraktów z jabłek Doktorant użył klasycznych metody spektrofotometrycznych oraz metod elektrochemicznych. Do pierwszej grupy należała metoda FRAP, jej modyfikacji z użyciem ferrozyny zamiast TPTZ oraz metoda DPPH. Do oznaczenia aktywności redukcyjnej związków fenolowych zastosowano cykliczną woltamperometrię (CV) i różnicową woltamperometrię pulsową (DPV). Pojemności redukcyjną ekstraktów z jabłek analizowano korzystając z metody CV. Na podstawie zarejestrowanych cyklicznych woltamperogramów badanych roztworów odczytywano wartości potencjałów pików anodowych oraz wyznaczano pole powierzchni pod krzywą pików anodowego utleniania. W przypadku ekstraktów z jabłek wyznaczano jedynie pole powierzchni pod krzywą pików anodowego utleniania.

Zdolność do chelatowania żelaza (II) zanalizowano metodą spektrofotometryczną przy użyciu ferrozyny jako czynnika kompleksującego oraz metody elektrochemicznej - różnicowej woltamperometrii pulsowej.

Ekstrakty związków fenolowych scharakteryzowano przez oznaczenie zawartości flawonoidów ogółem (z użyciem NaNO_2 i AlCl_3) i związków fenolowych ogółem (z użyciem odczynnika fenolowego Folin-Ciocalteu). Do dokładnego poznania związków fenolowych obecnych w ekstraktach z jabłek wykorzystano system mikro-HPLC sprzężony ze spektrometrem QTRAP.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników obejmowała jednoczynnikową analizę wariancji i test NIR Fishera.

W tym miejscu pragnę z uznaniem odnieść się do umiejętności analitycznych Doktoranta. Użył on do badań bardzo wielu metod analitycznych. Wykazał się znajomością nowoczesnych metod instrumentalnych stosowanych w analizie związków fenolowych i ich aktywności przeciwutleniającej. Doskonale opisane zostały postępowania analityczne. Forma graficzna tej części pracy (struktury chemiczne związków oraz woltamperogramy i fotografie aparatury pomiarowej) są bardzo wysokiej jakości.

W *Części Materiały i metody* Doktorant popełnił kilka błędów językowych i merytorycznych:

Str. 76 – Nieodpowiedni styl: powinno być „za pomocą ...”.

Str. 76 – Powinno być „stężeniu odpowiadającemu 20 mg liofilizatu/ml”.

Str. 76 – Wirowanie charakteryzuje się poprzez wartość „× g” a nie „rpm”.

Str. 79 i inne miejsca Dysertacji – Zdaniem recenzenta powinno być „rodników DPPH” a nie „rodników DPPH”.

Str. 89 – Co znaczy „optymalne parametry”?

Część pracy *Wyniki i dyskusja* (rozdział 5) oceniam bardzo wysoko. Doktorant w bardzo przystępny sposób podaje uzyskane wyniki, dyskutuje je z danymi literaturowymi, odnosi je do obowiązujących teorii. Ta część pracy jest łatwa w czytaniu. Odnośniki do tabeli i wykresów ułatwiają zrozumienie treści. Piśmiennictwo, do którego odwołuje się Doktorant, jest aktualne i prawidłowo dobrane. Na szczególne wyróżnienie zasługują fragmenty omawiające zależność pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą związków fenolowych a ich strukturą chemiczną.

Zdaniem recenzenta wyniki analizy korelacji pomiędzy aktywnością redukcyjną wyznaczoną metodami elektrochemicznymi i spektrofotometrycznymi powinny być przedstawiona na rysunku z uwzględnieniem równania regresji. Wartość współczynników korelacji powinna być w pracy podana z dokładnością do trzech miejsc po przecinku.

W rozdziale 6 Doktorant formułuje 9 *Wniosków* wypływających z uzyskanych wyników. Nie budzą one wątpliwości recenzenta. Podsumowują przeprowadzone badania i kładą odpowiednie akcenty na znaczenie poznawcze i użytkowe wyników. Mogę również uznać, że wnioski są adekwatne do celów pracy zawartych na str. 64.

Wniosek końcowy

Reasumując chciałbym stwierdzić, że pomimo zgłoszonych uwag i dostrzeżonych błędów oceniana praca wyróżnia się bardzo wysokim poziomem naukowym, wykonana została przy wykorzystaniu nowoczesnych metod badawczych, a uzyskane wyniki zostały przedstawione, przeanalizowane i zinterpretowane w

sposób wnikliwy. Na podkreślenie zasługuje duża wiedza chemiczna i biologiczna Doktoranta. Dzięki niej w Szej pracy mógł On poruszać wiele zagadnień z różnych obszarów nauk ścisłych i przyrodniczych.

Wartości merytoryczne pracy doktorskiej Pana magistra inżyniera Marcina Turemko pt. „Aktywność przeciwutleniająca związków polifenolowych w badaniach modelowych ze szczególnym uwzględnieniem metod elektrochemicznych” i wynikające z nich cenne możliwości aplikacyjne pozwalają mi na stwierdzenie, że spełnia ona wszystkie wymagania stawiane tego typu opracowaniom. Z pełnym przekonaniem przedkładam zatem do Rady Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pana magistra inżyniera Marcina Turemko do publicznej obrony niniejszej pracy.

Wysoki poziom naukowy ocenianej pracy motywuje mnie do złożenia Wysokiej Radzie wniosku o wyróżnienie Doktoranta w sposób praktykowany na Wydziale Nauki o Żywności.



Prof. dr hab. Ryszard Amarowicz