



Dr hab. inż. Krystian Marszałek, prof. IBPRS-PIB

Warszawa, 7.12.2022 r.

Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych,

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego
- Państwowy Instytut Badawczy

Ul. Rakowiecka 36

02-532 Warszawa

RECENZJA rozprawy doktorskiej

Recenzja przedłożonej rozprawy doktorskiej mgr inż. Oskara Marka Szczepaniaka pt. „**Charakterystyka derenia jadalnego (*Cornus mas* L.) jako źródła składników aktywnych kształtujących właściwości funkcjonalne żywności**”, wykonanej w Katedrze Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu składa się z oceny następujących elementów:

1. Ocena układu rozprawy doktorskiej i znaczenie tematu
2. Piśmiennictwo i znajomość literatury
3. Celowość prowadzonych badań
4. Materiał i metody badań
5. Omówienie wyników i prawidłowość wnioskowania
6. Możliwość praktycznego wykorzystania wyników badań
7. Oryginalność uzyskanych wyników i ocena końcowa
8. Wniosek o wyróżnienie

Podstawa prawna: Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami).

Podstawa formalna: Uchwała nr 2/XXI/I2022 Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 27 września 2022 roku.



Ad 1. Ocena układu rozprawy doktorskiej i znaczenie tematu

Pan mgr inż. Oskar Szczepanik w cyklu sześciu publikacji stanowiących rozprawę doktorską podjął się badań nad oceną jakości derenia jadalnego (*Cornus mas* L.) w kontekście kształtowania właściwości funkcjonalnych żywności.

Praca ma typowy układ charakterystyczny dla tego typu prac naukowych. Składa się z następujących rozdziałów: streszczenie, wprowadzenie, model i cel pracy doktorskiej, materiały i metody badawcze, wyniki i dyskusja, podsumowanie, zastosowanie praktyczne, źródła finansowania. Układ pracy jest logiczny a proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są prawidłowe. Praca spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, chociaż brakuje nieco dla ułatwienia oceny: spisu treści, charakterystyki sylwetki Kandydata czy dorobku naukowego i organizacyjnego. W pierwszej części pracy Autor przedstawił informacje ściśle związane z charakterystyką owoców derenia na podstawie przeglądu literatury. Z analizy tej wynika, że owoce derenia stanowią cenne źródło składników biologicznie aktywnych i mają duży potencjał do wykorzystania w praktyce przemysłowej. W przedstawionej pracy Autor dokonał szczegółowego przeglądu literatury światowej charakteryzując potencjał owoców derenia jako składnika żywności funkcjonalnej, w tym: makro i mikroelementów, antocyjanów i innych składników fenolowych, witaminy C oraz potencjału przeciwutleniającego i przeciwzapalnego.

Kandydat następnie scharakteryzował cel pracy, cele szczegółowe oraz odpowiadające im hipotezy badawcze. Rozwinięcie, uzasadnienie poszczególnych celów szczegółowych oraz odpowiedzi na stawiane hipotezy badawcze zawarto kolejno w przedstawionym do oceny cyklu sześciu publikacji. Warto tutaj podkreślić, że pod tym kątem praca jest spójna, i dokładnie przemyślana. Zakres pracy obejmował ocenę jakości siedmiu odmian derenia jadalnego pod kątem zawartości: polifenoli, flawonoidów, antocyjanów ogółem oraz pojemności przeciwutleniającej. Dodatkowo wykonano analizę chlorofilu ogółem oraz jego frakcji A i B, zawartości karotenoidów i witaminy C oraz chromatograficzne oznaczenie całkowitej zawartości wybranych flawonoidów i kwasów fenolowych. Po określeniu zawartości wybranych składników biologicznie aktywnych Autor podjął się również próby oceny: efektu hipoglikemicznego, ochronnego wobec DNA oraz hamowania aktywności receptorów smaku gorzkiego, co zasługuje na szczególne podkreślenie z uwagi na stopień skomplikowania procedury badawczej i ograniczoną ilość literatury w tym temacie. Na



kolejnych sześciu stronach maszynopisu dokonano omówienia uzyskanych wyników badań, ich dyskusję a następnie całość podsumowano krótkim rozdziałem w którym Autor odniósł się do stawianych hipotez badawczych. Na końcu pracy znalazły się oświadczenia współautorów wskazujące na jego udział w powstanie poszczególnych publikacji oraz maszynopisy wszystkich prac wchodzących w monotematyczny cykl będący przedmiotem rozprawy doktorskiej. Udział Pana magistra Szczepaniaka w powstaniu tych prac był znaczący i wynosił od 55 do 70%, co potwierdzili pozostali współautorzy prac. We wszystkich przedłożonych do oceny pracach Kandydat pełnił rolę pierwszego autora oraz autora korespondencyjnego, co świadczy o jego wiodącej roli w powstaniu tych prac.

Zagadnienia związane z wzbogacaniem produktów spożywczych surowcami wnoszącymi składniki biologicznie aktywne mające istotne znaczenie w żywieniu są aktualne, ważne dla nauki i praktyki. Wykorzystanie owoców derenia ma dużo zalet i stanowi perspektywę do praktycznego wykorzystania w opracowywaniu żywności funkcjonalnej, preparatów medycznych, suplementów diety o działaniu przeciwutleniającym, hipoglikemicznym czy w celu maskowania niepożądanego smaku gorzkiego. Podjętą tematykę badań w niniejszej pracy doktorskiej uważam za trafne, ważne oraz uzasadnione ze względów zarówno poznawczych jak i praktycznych. Z uwagi na ukierunkowanie całej pracy pod kątem kształtowania właściwości funkcjonalnych produktów z udziałem derenia, proszę o odpowiedź na pytania: jaki udział owoców derenia powinien znaleźć się w składzie przetworów z jego dodatkiem tak aby można było nazwać go produktem funkcjonalnym i zakomunikować to stosownymi oświadczeniami żywieniowymi i zdrowotnymi? Jakie przykładowe oświadczenia można będzie zastosować w tego typu produktach?

Na uwagę i podkreślenie zasługuje fakt, że badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju; Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, statutowych środków UE w Poznaniu, co świadczy o wysokiej aktywności w pozyskiwaniu środków na realizację badań.

Ad 2. Piśmiennictwo i znajomość literatury

Dysertacja doktorska składa się czterdziestu stron maszynopisu, z których osiem to spis literatury obejmujący 90 pozycji, w których aż 60% stanowią pozycje z ostatnich 10 lat. Jest to bardzo istotne i świadczy o znajomości najnowszej literatury w zakresie podjętej tematyki badań. Zdecydowana większość prac, z wyjątkiem pięciu, jest w języku angielskim co świadczy o znajomości literatury światowej w przedmiotowym zakresie. Zebrana i



przestudiowana literatura ściśle związana jest z tematem badań i wskazuje na pracowitość oraz dociekliwość naukową w rozwiązywaniu problemów badawczych. Recenzent nie ma zastrzeżeń do znajomości tematu, zakresu zebranej literatury naukowej oraz sposobu jej wykorzystania.

Ad 3. Celowość prowadzonych badań

Złożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Oskara Szczepaniaka została przygotowana na podstawie sześciu monotematycznych publikacji. Celem pracy była charakterystyka i oznaczanie zawartości związków biologicznie czynnych w owocach 7 odmian derenia jadalnego (*Cornus mas* L.) a następnie ocena możliwości wykorzystania derenia będącego źródłem związków aktywnych, jako składnika żywności funkcjonalnej. O ile charakterystyka chemiczna owoców derenia była już przedmiotem innych prac badawczych to wykorzystanie tych owoców w projektowaniu żywności funkcjonalnej, badanie ich potencjału hipoglikemicznego, ochronnego wpływu na DNA lub w celu maskowania smaku gorzkiego w produktach spożywczych jest nowym kierunkiem badań i wnosi nową wiedzę do dyscypliny. Recenzent nie ma żadnych zastrzeżeń pod względem celowości i zasadności prowadzonych badań.

Ad 4. Materiał i metody badań

Pan mgr inż. Oskar Szczepaniak w swojej pracy wykorzystał owoce derenia jadalnego siedmiu odmian: *Bolestraszycki*, *Wydubiecki*, *Szafer*, *Jolico*, *Florianka*, *Słowianin* i *P5*. Owoce zostały zebrane w gospodarstwie sadowniczym o znanym położeniu geograficznym gdzie monitorowano podstawowe parametry gleby, średnią temperaturę i średnią liczbę opadów, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu i zaplanowaniu eksperymentu. Surowcem do badań były owoce przechowywane w warunkach chłodniczych lub mrożone na potrzeby realizacji kolejnych etapów pracy. Materiałem badanym były ekstrakty wodne i alkoholowe przygotowane z owoców derenia przygotowane poprzez nacięcie skórki owoców i ich macerację w wodzie lub roztworze alkoholu. Jest to nowe podejście w związku z powyższym proszę o wyjaśnienie, dlaczego nie zhomogenizowano owoców w celu ułatwienia ekstrakcji związków bioaktywnych do ekstraktu i czy autor miał pewność, że uzyskane ekstrakty odpowiadają w pełni charakterystyce owoców derenia jak zawarto w tytule pracy?

Kandydat zastosował w swojej pracy zarówno podstawowe spektrofotometryczne techniki analityczne pozwalające na oznaczanie: polifenoli, flawonoidów, antocyjanów i chlorofili ogółem oraz witaminy C czy też bardziej zaawansowane metody z wykorzystaniem



spektrofotometru diodowego sprzężonego z wysokosprawnym chromatografem cieczowym w celu analizy profilu flawonoidów i kwasów fenolowych w badanych ekstraktach. Dodatkowo przeprowadzono analizę właściwości przeciwutleniających metodami z kationorodnikami ABTS⁺ oraz rodnikami DPPH. Metodą spektrofotometryczną. Na podkreślenie i uwagę zasługuje szczególnie część badań poświęcona ocenie wpływu wybranych odmian derenia jadalnego na efekt przeciwcukrzycowy, geno-ochronny i aktywność receptorów z rodziny TAS2R odpowiedzialnych za odczucie smaku gorzkiego. Moja uwaga stylistyczna dotycząca tej części pracy odnosi się do zaproponowanych skrótów angielskich, których wykorzystanie w dalszej części pracy często nie koresponduje z językiem polskim, np. „testem TCP”, „najniższą wartością TPC”, „TFC mieściło się”, czy też skróty myślowe takie jak: „testami ABTS i DPPH”, „rodnika ABTS oraz DPPH”. Autor nadużywa słowo „test” przy omawianiu uzyskanych wyników badań, co czasami prowadzi do niefortunnych sformułowań.

Autor zaplanował i przeprowadził analizy fizykochemiczne w prawidłowy sposób a uzyskane wyniki badań pozwoliły mu na wyciągnięcie wniosków i potwierdzenie bądź obalenie stawianych hipotez badawczych. Wszystkie prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych recenzowanych przez międzynarodowych ekspertów, co potwierdza wysoką jakość prowadzonych badań. Proszę jednak o uzasadnienie co skłoniło Kandydata do podjęcia próby zbadania występujących w śladowych ilościach chlorofili i karotenoidów w czerwonych owocach derenia, które są dobrym źródłem barwników antocyjanowych oraz jakie było LOD i LOQ metod stosowanych do oznaczania tych związków? W przedstawionych pracach uzyskane wyniki przeliczano na świeżą masę ekstraktów lub suchą masę ekstraktów. Dlaczego Autor nie zdecydował się przeliczać wyników na świeżą lub suchą masę owoców? Oczywiście mogło to wynikać z sugestii recenzentów poszczególnych publikacji na różnych etapach oceny ale niewątpliwie utrudnia to interpretację uzyskanych wyników dla całego cyklu publikacji. Na przykład w pracy nr 2 ogólna zawartość polifenoli wynosiła od 290 do 774 mg GAE/ 100 g suchej masy ekstraktów wodnych oraz od 550 do 2598 mg GAE/ 100 g suchej masy ekstraktu alkoholowego, natomiast w pracy nr 3 uzyskane wyniki przeliczono na świeżą masę ekstraktu alkoholowego i wynosiły one jedynie 15 do 19 g GAE/ 100 g. W pracy tej wystąpiła najprawdopodobniej literówka i chodziło o miligramy a nie gramy ale mimo to porównanie uzyskanych wyników jest trudne. Proszę o krótkie wyjaśnienie w tej kwestii.



Zastosowane metody analityczne były złożone i czasochłonne, wymagały zaangażowania, precyzji i dużego nakładu pracy oraz w pełni pozwoliły zrealizować ambitny cel badań. Uzyskanie nowych wyników badań, szczególnie w drugiej części pracy, pozwoliło na opublikowanie uzyskanych wyników w renomowanych wysoko punktowanych czasopismach naukowych.

Ad 5. Omówienie wyników i prawidłowość wnioskowania

Wyniki uzyskane przez mgr inż. Oskara Szczepaniaka w pierwszej części pracy dotyczyły oceny jakości ekstraktów wodnych i alkoholowych przygotowanych z owoców derenia jadalnego. Kandydat wskazał, że największą zawartością polifenoli oraz flawonoidów charakteryzował się ekstrakt alkoholowy uzyskany odpowiednio z odmian *Jolico* oraz *Szafer* i zaobserwował, że ekstrakty alkoholowe zawierają znacząco wyższą zawartość polifenoli ogółem w porównaniu do ekstraktów wodnych. Odmiana *Szafer* charakteryzowała się najwyższą zawartością barwników antocyjanowych, natomiast odmiana *Jolico* najwyższą zawartością witaminy C. Analiza chromatograficzna wykazała, że na ogólną zawartość polifenoli największy wpływ miały związki takie jak: kwas chlorogenowy i galusowy, kwercetyna, rutyna i naringenina. Najwyższą zdolnością do zmiatania wolnych rodników ABTS⁺ charakteryzowały się ekstrakty wodne z odmian *Słowianin* i *Szafer*, natomiast w przeliczeniu na suchą masę były to odmiany *Jolico* i *Słowianin*. Rozbieżności te potwierdzają jedynie, że w pracy wskazane było by przeliczanie wszystkich uzyskanych wyników w ten sam sposób tak aby wyciągnąć bardziej ogólne wnioski. W związku z tym do omawianej części mam następujące pytania: jak Kandydat tłumaczy fakt, iż najwyższą zdolność do zmiatania wolnych rodników ABTS⁺ charakteryzowały się ekstrakty wodne, natomiast najwyższą zawartością polifenoli ekstrakty alkoholowe? Jak wytłumaczyć fakt iż, w przypadku metody z wykorzystaniem rodników DPPH[•] uzyskano odwrotną zależność oraz podobne rozbieżności pomiędzy dwoma stosowanymi metodami elektrochemicznymi?

W kolejnej części pracy Autor dokonał wyselekcjonowania odmian derenia, na podstawie zawartości związków biologicznie aktywnych, do dalszych prac mających na celu ocenę efektu przeciwcukrzycowego poprzez inhibicję aktywności α -glukozydazy. Spośród badanych odmian owoców najsilniejszy efekt wykazywał ekstrakt wodny przygotowany z odmiany *P5*, który zawierał jednocześnie najmniej barwników antocyjanowych, natomiast odmiana *Szafer*, która zawierała najwięcej tych składników wykazywała się najsłabszą zdolnością do inhibicji α -glukozydazy. Skąd więc wniosek Autora, że „istnieje bardzo silna



liniowa korelacja pomiędzy TAC a zdolnością do inhibicji α -glukozydazy ($r = 0,93$)” skoro uzyskane wyniki badań wskazują na korelację odwrotną? Jakże, związki obecne w owocach derenia, zdaniem Autora mogą odpowiadać za uzyskany efekt przeciwcukrzycowy?

Oddziaływanie składników bioaktywnych obecnych w ekstraktach z owoców derenia jadalnego z dwuniciowym DNA skutkowało zwiększeniem powierzchni sygnałów zasad purynowych co może oznaczać, że struktura podwójnej helisy uległa zmianie. Analiza PCA uzyskanych wyników wykazała bardzo interesujące wyniki wskazujące na to, że tylko alkoholowe ekstrakty przygotowane z owoców odmian *Szafer* i *Słowianin* wykazywały efekt geno-ochronny. W badaniach wykazano, że najsilniejszą interakcję z oligonukleotydem testowanym w badaniu elektrochemicznym wykazywały flawonoidy. Wykazywały one efekt ochronny dla 8-oxoGC, wyższy niż dla par GC i AT, co wg Autora wskazuje, że związki te mogą nie tylko chronić DNA przed utlenianiem ale również wtedy, gdy do procesu utleniania już doszło. Wyniki są bardzo ciekawe i obiecujące, ale zalecam ostrożność przy wyciąganiu tego typu wniosków, gdyż na uzyskany efekt może mieć wpływ wiele czynników nie branych pod uwagę podczas eksperymentu.

Bardzo ciekawe wyniki Kandydat uzyskał również w ocenie inhibicji receptorów TAS2R. Eksperyment z użyciem transfekowanych komórek linii HEK 293T pokazał, iż składniki aktywne zawarte w stężonych ekstraktach owoców derenia obniżają aktywność receptorów maku słodkiego, natomiast rozcieńczonego 10-krotnie zwiększanie aktywności tych receptorów. Niestety zaobserwowano, że efekt hamowania smaku gorzkiego był bardzo krótki i nieistotny statystycznie. W związku z powyższym moja sugestia dotycząca efektów, które nie zostały potwierdzone statystycznie jest taka, że nie powinny być one przedmiotem dyskusji i wyciągania wniosków. Nie mniej jednak Pan mgr inż. Oskar Szczepanik przeprowadził dodatkowy eksperyment polegający na zweryfikowaniu postawionej hipotezy badawczej dotyczącej maskowania smaku gorzkiego w badaniach sensorycznych na przykładzie gorzkiej czekolady. W uzyskanych wynikach badań zaobserwowano, że dodatek zliofilizowanych owoców derenia skutkowało obniżeniem odczuwania smaku gorzkiego przy jednoczesnym wzroście intensywności smaku słodkiego i cierpkiego, co wskazuje na zasadność prowadzenia dalszych badań w tym zakresie i poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów zachodzących w tych reakcjach. Analiza PCA wykazała, że podwyższona zawartość rutyny, kwasu galusowego i chlorogenowego może pobudzać odczuwanie smaku gorzkiego. Na wyjaśnienie zasługuje fakt, w jaki sposób dodatek bakterii probiotycznych do



czekolady mógł mieć wpływ na maskowanie goryczy oraz w jakim celu dodano te bakterie do czekolady skoro to nie wchodziło w zakres pracy doktorskiej?

W przedstawionym do recenzji autoreferacie nieco zabrakło mi dogłębnej dyskusji uzyskanych wyników z literaturą światową, nie mniej jednak w każdej z przedstawionych w cyklu publikacji dyskusja ta miała miejsce, dlatego też nie jest to zarzut umniejszający wartość całej pracy doktorskiej. Rozumiem, że Kandydat chciał przedstawiać wyniki badań w autoreferacie w sposób jak najbardziej zwięzły.

Ad 6. Możliwość praktycznego wykorzystania wyników badań

Wyniki pracy mogą być jak najbardziej wykorzystane w praktyce przemysłowej przy projektowaniu żywności funkcjonalnej oraz przy tworzeniu preparatów medycznych i suplementów diety stosowanych przez diabetyków i w celach profilaktycznych.

Ad 7. Oryginalność uzyskanych wyników i ocena końcowa

Podsumowując stwierdzam, że koncepcja pracy, jej założenia i sposób przeprowadzenia eksperymentów były poprawne i przeprowadzone w sposób profesjonalny a uzyskane wyniki przyczyniły się do sukcesu naukowego jakim jest przedłożona do oceny praca doktorska stanowiąca monotematyczny cykl publikacji. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na pogłębienie aktualnego stanu wiedzy na temat wpływu owoców mniej znanych takich, jak dereń jadalny na efekt przeciwcukrzycowy, geno-ochronny i kształtujący odczucie smaku gorzkiego w produktach spożywczych.

O szczególnej wartości wyników badań mgr inż. Oskara Szczepaniaka świadczy opublikowanie ich w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu światowym, znajdujących się również na liście czasopism punktowanych MEiN. Przedstawiony cykl publikacji stanowi sześć prac opublikowanych w czasopismach takich jak: dwie prace w *European Food Research and Technology* (IF=2,366, 70 pkt), *CYTA – Journal of Food* (IF=1,653, 40 pkt), *International Journal of Food Properties* (IF= 3,388, 70 pkt), *Biomedicine & Pharmacotherapy* (IF=7,419, 100 pkt) oraz *PLOS ONE* (IF= 3,752, 100 pkt).

Publikacje te były poddane wnikliwym międzynarodowym recenzjom i przyjęcie ich do druku świadczy o bardzo wysokiej wartości naukowej. Musiały spełnić najwyższe standardy stawiane publikacjom naukowym odnośnie sposobu przedstawienia wyników, ich interpretacji, dyskusji oraz wyciągania wniosków.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana praca doktorska jest oryginalnym i wartościowym osiągnięciem naukowym, a przedstawione uwagi nie rzutują na jej wysoką wartość



naukową. Uważam, że rozprawa doktorska będąca przedmiotem oceny w pełni odpowiada wymaganiom stawianym w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U.Nr 65, poz.595, z późn. zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Proszę zatem Wysoką Radę Naukową Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Oskara Szczepaniaka do dalszych etapów ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Ad 8. Wniosek o wyróżnienie

Przedstawiona do oceny praca spełnia wszystkie kryteria określone przez Radę Naukową Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W ocenie Recenzenta przedłożona do oceny praca istotnie przekracza średni poziom prac doktorskich, biorąc pod uwagę rangę rozwiązywanego problemu oraz jakość i zakres zrealizowanych badań. Efektem realizacji tych badań było opublikowanie uzyskanych wyników w czasopismach naukowych z listy JCR, których łączny IF, zgodnie z datą publikacji wynosi 20,944 a sumaryczna punktów MEIN zgodnie z aktualnym wykazem czasopism punktowanych 450 pkt. Wskaźniki te są niewątpliwie wskaźnikami wyróżniającymi się. Ponadto Kandydat podjął próbę bardzo trudnej oceny efektu hipoglikemicznego, ochronnego wobec DNA oraz hamowania aktywności receptorów smaku gorzkiego, co zasługuje na szczególne podkreślenie. Warto również podkreślić, że wszystkie prace sfinansowane zostały ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju; Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, statutowych środków UE w Poznaniu, co świadczy o wysokiej aktywności całego zespołu, w tym Promotorów w pozyskiwaniu środków na realizację badań.

W związku z powyższym zwracam się z wnioskiem do Komisji Doktorskiej oraz Rady Naukowej Dyscypliny o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej Pana mgr inż. Oskara Szczepaniaka.

Dr hab. inż. Krystian Marszałek, prof. IBPRS-PIB