

Prof. dr hab. inż. Grażyna Budryn
Instytut Technologii i Analizy Żywności
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Oskara Szczepaniaka,
wykonanej w Katedrze Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej
na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu,
której Promotorami są dr hab. inż. Joanna Kobus-Cisowska, prof. UPP i dr hab. Marta Ligaj,
pt: „Charakterystyka derenia jadalnego (*Cornus mas* L.) jako źródła składników aktywnych
kształtujących właściwości funkcjonalne żywności”

Recenzja wykonana na podstawie Uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dn. 27 września 2022 r.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie cyklu 6 Publikacji,
których dokładne dane bibliograficzne i ich numeracja przedstawione są w dysertacji,
zaopatrzonych dodatkowym Omówieniem Publikacji przedstawionym na 40 stronach.

Wartość merytoryczna rozprawy

Terminy użyte w temacie rozprawy doktorskiej można w tym miejscu bardzo krótko zdefiniować. Substancje bioaktywne występujące w niewielkich zwyczaj ilościach w roślinach zielarskich i produktach żywnościowych, takich jak owoce, warzywa, orzechy, oleje i produkty pełnoziarniste, mają działanie, które może sprzyjać zachowaniu dobrostanu organizmu ludzkiego. Są szeroko badane w celu oceny możliwości ich stosowania w profilaktyce i wspomaganiu leczenia przewlekłych chorób cywilizacyjnych. Ich wysoka zawartość w żywności naturalnej lub wzbogacanej pozwala na wyodrębnienie na rynku produktów funkcjonalnych, oferujących korzyści zdrowotne wykraczające poza wartość odżywczą.

Poszukiwanie nowych źródeł związków bioaktywnych jest bardzo ważnym zagadnieniem badawczym od szeregu lat. W pracach krajowych warto koncentrować się na badaniach bioaktywnych właściwości surowców pochodzących z Polski, dzięki czemu można w sposób bardziej ukierunkowany promować uprawy, także te mniej rozpowszechnione i pośrednio wspierać ich producentów. Jak wspomniano, owoce, w tym pestkowe, są częstym obiektem badań właściwości bioaktywnych i funkcjonalnych, jednak w zbiorach bibliograficznych prace naukowe odnoszące się do derenia stanowią relatywnie niewielką część.

Przegląd literatury, dokonany w sposób dojrzały i umiejętny przez Pana mgr inż. Oskara Szczepaniaka i przedstawiony w Publikacji 1 oraz we wstępach zamieszczonych w dalszych Publikacjach, wprowadza w podjętą tematykę badawczą. Najważniejsze wnioski wynikające z krytycznej analizy literatury przedmiotu opracowanej przez Doktoranta wskazują, że dereń jadalny (*Cornus mas* L.) jest stosowany jako produkt spożywczy, a także tradycyjny lek ziołowy, w szerokim pasie od środkowej i południowej Europy, przez Azję Mniejszą i Kaukaz po region subhimalajski. Obecnie znane dowody jego spożywania datowane są na V w. p.n.e. Posiada on wysoką wartość

bioaktywną, związaną głównie z działaniem przeciwutleniającym i przeciwzapalnym, którego konsekwencją jest aktywność przeciwcukrzycowa, hipolipidemiczna, przeciwmiażdżycowa, a także działanie cytoprotekcyjne, hepatoprotekcyjne, neuroprotekcyjne, przeciwdrobnoustrojowe i przeciw pasożytnicze. Właściwości funkcjonalne derenia przypisuje się obecności substancji o działaniu antyoksydacyjnym, obejmujących antocyjany, flawonoidy, irydoidy, kwasy fenolowe i taniny oraz witaminę C. Dereń jest także bogatym źródłem niektórych niezbędnych minerałów, głównie potasu i magnezu. Dereń jest zatem surowcem wciąż mało docenianym mimo bardzo wartościowego składu, stąd wybór tematyki badawczej dysertacji uważam za w pełni uzasadniony.

Innowacyjność recenzowanych badań Doktorant wskazał w 4 zagadnieniach składających się na cel pracy, które sformułowano na podstawie zaproponowanych 4 hipotez badawczych. Dotyczą one charakterystyki krajowych odmian derenia oraz zastosowania owoców derenia do otrzymania nowej żywności funkcjonalnej o atrakcyjnych cechach sensorycznych.

Praca obejmuje od strony metodycznej przygotowanie wodnych i etanolowych ekstraktów z owoców derenia jadalnego, badanie ekstraktów w zakresie profilu związków o właściwościach przeciwutleniających, określenie właściwości hipoglikemicznych, genoprotekcyjnych oraz modulujących odpowiedź receptorów smakowych, a w ostatnim etapie przygotowanie funkcjonalnej czekolady zawierającej owoce derenia i jej ocenę organoleptyczną oraz aktywności przeciwutleniającej. Doktorant analizował zawartość polifenoli ogółem, flawonoidów, antocyjanów, chlorofilu, karotenoidów, kwasu askorbinowego, cukrów, aglikonowych form najważniejszych kwasów fenolowych i flawonoidów, aktywność zmiatania syntetycznych rodników w środowisku hydrofilowym, potencjał redoks, aktywność hamowania alfa-glukozydazy, stopień wchłaniania wybranych związków bioaktywnych, interakcje z DNA i hamowanie jego utleniania, także oddziaływania z receptorami białkowymi TAS2R w odmianie 3 i 13, rejestrowane jako wyrzut kationów wapnia do cytoplazmy oraz profil sensoryczny funkcjonalnej czekolady. Należy zatem podkreślić, że stosowane metody obejmują bardzo szerokie spektrum technik badawczych stosowanych w technologii żywności, analizie fizykochemicznej i sensorycznej żywności, inżynierii genetycznej oraz biologii molekularnej. W szczególności stosowane techniki analityczne obejmują przeprowadzanie specyficznych reakcji z wytworzeniem barwnych produktów i ich detekcję kolorymetryczną, elektrochemiczną, fluorymetryczną, chromatografię cieczową z detektorem spektrofotometrycznym o matrycy diodowej oraz refraktometrycznym, trawienie żołądkowo-jelitowe *in vitro*, symulację dokowania molekularnego i profilowanie sensoryczne z udziałem panelu ekspertów.

Wartość naukowa rozprawy

Zgodnie z przyjętymi hipotezami badawczymi Doktorant postawił sobie za zadanie wykazanie różnicowania w zawartości wtórnych metabolitów oraz aktywności antyoksydacyjnej owoców derenia różnych odmian krajowych, hamowanie aktywności alfa-glukozydazy, obniżenie stopnia uszkodzeń oksydacyjnych zasad azotowych DNA w warunkach stresu oksydacyjnego, na skutek oddziaływań z flawonoidami i kwasami fenolowymi pochodzącymi z derenia, oraz maskowanie gorzkiego smaku czekolady przez składniki derenia. Do potwierdzenia hipotez badawczych Pan mgr inż. Oskar Szczepaniak zastosował szereg klasycznych i nowoczesnych metod analitycznych, wszystkie one były adekwatne do tego, aby zweryfikować prawdopodobieństwo przyjętych hipotez. Do metod nowoczesnych zaliczyć można ocenę potencjału antyoksydacyjnego, jak również stopnia interakcji nutraceutyków pochodzących z derenia z DNA w teście elektrochemicznym z pomiarem woltametrycznym, a także ocenę odpowiedzi receptorów smaku gorzkiego uzyskanych w wyniku transfekowania komórek linii HEK 293T i symulację dokowania molekularnego *in silico*. Wyniki badań poddawane były złożonej analizie statystycznej, w której stosowano, w uzupełnieniu do analizy wariancji i analizy różnic istotnych statystycznie, analizę korelacji i analizę składowych głównych.

Poprzez fakt, że Publikacje uszeregowane są jako kolejne etapy badawcze w pewien cykl, można zauważyć i należy to podkreślić, że Doktorant w miarę weryfikacji kolejnych hipotez badawczych poszukiwał coraz bardziej zaawansowanych metod i znacząco rozbudowywał swój warsztat badawczy, przy czym każdą z hipotez potwierdzał więcej niż jedną metodą. Jak zostało to już wcześniej podkreślone, zakres problemów badawczych oraz technik stosowanych do ich rozwiązania był bardzo szeroki. Pierwsze wyniki umożliwiły wybór odmian derenia najbardziej obiecujących pod względem bioaktywności do kolejnych testów. Pod tym względem cykl publikacji zachowuje niewątpliwie dużą spójność, nawet jeśli na aktywność hamowania alfa-glukozydazy nie wpływa bezpośrednio aktywność antyoksydacyjna nutraceutyków derenia, to zbadano korelację pomiędzy tymi właściwościami. Dobór hipotez badawczych pokazuje jednocześnie, że Doktorant dobrze rozumie potrzeby współczesnej nauki w zakresie badań żywności, czyli z jednej strony konieczność włączania się w badania podstawowe w ujęciu międzynarodowym, a z drugiej, uzyskiwanie bardziej aplikacyjnych wyników, które mogą zostać skomercjalizowane w krótkim czasie.

Wysoka wartość naukowa badań została wcześniej potwierdzona przez recenzentów, oceniających prace składające się na dysertację, w ramach procesu wydawniczego. Publikacje ukazały się w języku angielskim, w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, ich sumaryczny IF zgodnie z rokiem publikacji przekracza 22, H indeks wg Scopus na dzień przygotowania recenzji wynosi 3, a liczba cytowań 66.

Jako najbardziej wartościowe osiągnięcia naukowe pracy doktorskiej należy wymienić:

- wskazanie wśród analizowanych związków bioaktywnych derenia tych o najwyższej aktywności antyoksydacyjnej i odmian obfitujących w te związki,
- wykazanie słabej korelacji pomiędzy barwą owoców derenia a zawartością badanych związków bioaktywnych,
- wykazanie aktywności hipoglikemicznej na podstawie hamowania zdolności amyrolitycznych alfa-glukozydazy przez badane metabolity wtórne derenia, w szczególności przez kwas loganowy należący do grupy irydoidów,
- wykazanie oddziaływania związków bioaktywnych derenia z DNA, również w formie utlenionej, wskazującego na potencjał genoprotekcyjny badanych nutraceutyków,
- wykazanie wysoce akceptowalnych właściwości organoleptycznych ciemnej czekolady wzbogaconej w proszek z liofilizowanego derenia.

Doktorant wytypował odmianę Bolestraszycki jako wartościową odmianę krajową szczególnie bogatą w składniki bioaktywne, która mogłaby być stosowana do otrzymywania żywności funkcjonalnej o potencjalnym działaniu hipoglikemicznym i genoprotekcyjnym.

Uwagi krytyczne

Wstęp teoretyczny Omówienia Publikacji oraz Publikacja 1 charakteryzuje bioaktywne składniki derenia i przytacza ich zawartości. Dobrym podsumowaniem opisu składu owoców derenia byłaby tabela podająca ogólną wartość odżywczą tego owocu oraz zawartość najważniejszych nutraceutyków.

We Wstępie teoretycznym na stronie 7 Omówienia Publikacji Doktorant zaliczył katechiny do kwasów fenolowych, podczas gdy jest to rodzina flawanoli.

W tym samym punkcie na stronie 19 Omówienia Publikacji jako źródło bibliograficzne opisu metody wygaszania rodnika DPPH podano publikację nr 80 (Kobus-Cisowska i wsp. *In vitro* screening for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition and antimicrobial activity of chia seeds (*Salvia hispanica*). *Electronic Journal of Biotechnology*, 37, (2019) 1–10), podczas gdy w zacytowanej publikacji to oznaczenie nie zostało wykorzystane ani opisane.

Na stronie 20 Omówienia Publikacji opisano, że do badania inhibicji alfa-glukozydazy stosowano dawki ekstraktów 486,6-555,56 µg/ml w przypadku odmiany P5 i równie precyzyjne, ale inne, dawki pozostałych 2 odmian. Nie jest jasne, dlaczego dawki były akurat takiej wielkości i dlaczego nie były jednakowe w przekroju 3 odmian.

Na stronie 23 Omówienia Publikacji podano, że czekoladę wzbogaconą w sproszkowany liofilizat z owoców derenia oraz czekoladę z tym dodatkiem i z preparatem bakterii probiotycznych otrzymywano przez rozpuszczenie czekolady klasycznej, dodanie odpowiednich proszków i zestalenie w temperaturze 21 °C. W tak otrzymanych kostkach czekolady oznaczano cechy sensoryczne takie jak twardość i topliwość. Jednym z głównych składników czekolady jest tłuszcz kakaowy, który, zgodnie z aktualną wiedzą, musi krystalizować w sposób kontrolowany. Przy zestalaniu czekolady w temperaturze 21 °C powstała kostka jest krucha i zbyt łatwo się topi. Proces krystalizacji należy prowadzić w taki sposób, aby czekolada składała się z jak największej liczby kryształów o najbardziej stabilnej formie krystalicznej. W tym celu masę czekoladową podgrzewa się do około 30 °C, temperuje i szybko schładza, co zapewnia uzyskanie kostek twardych, które bardzo dobrze się łamią i topią w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała (37 °C). Co za tym idzie, porównanie kostki czekolady klasycznej z wariantami wzbogaconymi w zakresie twardości i topliwości mogło być niemiarodajne.

W odniesieniu do wzbogacania w polifenole czekolady należy zauważyć że ziarno kakaowe, a stąd czekolada, szczególnie ciemna, jest bardzo dobrym źródłem polifenoli, w 100 g zawiera ich 2500-4000 mg (Urbańska, B.; Kowalska, J. Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the world. *Antioxidants* 2019, 8, 283). Wyjątkiem jest biała czekolada, która nie zawiera miazgi kakaowej i celowe jest wzbogacanie jej w polifenole.

W publikacji Gozlekci, S i wsp. (2017). Mineral content of Cornelian cherry (*Cornus mas L.*) fruits. *Oxidation Communications*. 40. 301-308 autorzy przytoczyli zawartość potasu w owocach derenia na poziomie ok. 3.000 mg/kg, podczas gdy Doktorant w Publikacji 1 zasugerował 10-krotnie wyższą zawartość. W związku z tym, wymaga dodatkowego wyjaśnienia ilość owocu, jaką należy spożyć, aby zapewnić pełne dzienne zapotrzebowanie na ten pierwiastek.

Opisując zawartość cukrów redukujących w owocach derenia na podstawie danych literaturowych Doktorant określił ich zawartość w genotypach tureckich, na poziomie 3-7%, jako podobną do tej w genotypach serbskich, 14-21%. Nie jest jasne, wg jakich kryteriów te dwa poziomy zostały po porównaniu uznane za podobne.

W Publikacji przeglądowej 1 Pan mgr inż. Szczepaniak zaliczył do najważniejszych grup składników bioaktywnych w owocach derenia taniny, ale nie opisał tej grupy związków.

W Publikacjach 2-4 nie wyodrębniono podpunktu dotyczącego opisu stosowanych substancji chemicznych i odczynników, szczególnie w Publikacji 3, gdzie identyfikowano kwasy fenolowe i flawonoidy, nie podano, ile i jakiej jakości standardy stosowano do identyfikacji.

W Publikacji 2 podano całkowitą zawartość polifenoli w Tabeli 2 w zakresie od ok 290 do 2.600 mg/100 g s.s, a w Publikacji 3 zakres 15.000 – 20.000 mg/100 g świeżej masy, a zatem średnio 60.000-80.000 mg/100 g s.s. Nie jest jasne, dlaczego badane próby derenia różniły się tak istotnie.

W Publikacji 4 analizowano stopień wchłaniania kwasu loganowego w modelu żołądkowym. Największa część składników żywności jest wchłaniana w jelicie cienkim, podczas gdy zastosowanie modelu żołądkowego nie zostało uzasadnione, a przytoczona metodyka nie jest zaopatrzona referencją. Natomiast w dyskusji wyników wchłaniania odniesiono się do publikacji Kawy-Rygielskiej i wsp. Bioactive compounds in Cornelian cherry vinegars. *Molecules*. 2018. 23, 379, w której nie badano wchłaniania nutraceutyków.

W Publikacji 6 do czekolady dodawano liofilizowane owoce derenia w postaci proszku, także w połączeniu z preparatem bakterii probiotycznych. Nie wskazano, czy któryś z tych wariantów spełnia kryteria żywności funkcjonalnej oraz jakie oświadczenie zdrowotne można by zastosować do takiego produktu.

Przedstawione uwagi wymagają wyjaśnienia, niemniej nie umniejszają wysokiej wartości naukowej i poznawczej ocenianej Dysertacji.

Poprawność redakcyjna rozprawy

W Omówieniu Publikacji w wersji angielskiej Streszczenia podano, że badanych było 6, zamiast 7 odmian derenia.

W punkcie Charakterystyka badanych odmian na stronie 18 Omówienia Publikacji podano, że ekstrakty z derenia były przechowywane w temperaturze 21 °C do czasu oznaczeń, podczas gdy chodziło o temperaturę -21 °C, co zostało podane poprawnie w odnośnej Publikacji 4.

W wielu zdaniach Omówienia Publikacji niewłaściwie użyto przyimek „dla”, np. we frazie „Klimenko .. szacuje, że dla jednego ... krzewu derenia .. można uzyskać wydajność ... 10 kg”, podczas gdy bardziej właściwym przyimkiem byłby „z”, gdyż plon jest dla konsumenta z krzewu.

Na stronie 11 Omówienia Publikacji we Wprowadzeniu napisano „niska wartość pH soku z owoców derenia jadalnego (pH powyżej 2,4)”. Czy poprawnie miało być: „pH poniżej 2,4”?

Publikacja 1, „pH ... 2 ... caused ... whereas a decrease of the pH to 4.0”? Czy poprawnie miało być: „increase”?

W Publikacji 6 w podrozdziale Fruit preparation napisano, “frozen Cornelian cherry fruits were dried in a freeze dryer at a pressure of 1.030 bar”, podczas gdy w procesie tym stosuje się głęboką próżnię.

W Publikacji 6 nie opisano enzymów, jakie były stosowane do przeprowadzenia symulacji trawienia.

Ocena końcowa

Stwierdzam, że Doktorant wykazał się umiejętnościami oryginalnego rozwiązywania problemu naukowego i zrealizował cel postawiony w pracy. Rozprawa doktorska prezentuje znajomość ogólnej wiedzy mgr inż. Szczepaniaka w dyscyplinie technologia żywności i żywienia i potwierdza umiejętność Doktoranta samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Recenzowana Rozprawa doktorska mgr inż. Oskara Szczepaniaka spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr inż. Oskara Szczepaniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, wskazując na wysoką wartość naukową i poznawczą ocenianej Dysertacji, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o wyróżnienie recenzowanej Rozprawy Doktorskiej Pana mgr inż. Oskara Szczepaniaka.

Grażyna Białogłowa