**dr hab. inż. Anna Gliszczyńska-Świgło, prof. nadzw. UEP**
**Katedra Technologii i Analizy Instrumentalnej**
**Wydział Towaroznawstwa**
**Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Teresy Przeor „Wpływ zabiegów technologicznych na zawartość i właściwości bioaktywnych związków w preparatach z liści morwy białej"**

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (Uchwała z dnia 27 marca 2014 r., pismo z dnia 25 sierpnia 2017 r.).

Praca doktorska pt. „Wpływ zabiegów technologicznych na zawartość i właściwości bioaktywnych związków w preparatach z liści morwy białej" została przygotowana przez mgr inż. Monikę Teresę Przeor w Katedrze Technologii Żywienia Człowieka pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Ewy Flaczyk.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowanie naturalnymi sposobami zapobiegania i wspomagania leczenia wielu chorób. Jednym z nich jest włączenie do codziennej diety niektórych owoców, warzyw, ziół, suplementów diety na bazie surowców roślinnych lub wyciągów z roślin. Jedną z takich roślin jest morwa biała (*Morus alba*), która znana była jako roślina lecznicza już w starożytnych Chinach. Medycyna Dalekiego Wschodu wykorzystywała jej liście, korę, korzenie oraz owoce w leczeniu wielu schorzeń. Liczne badania wskazują, że związki biologicznie czynne morwy białej korzystnie wpływają na układ krążenia, moczowy czy nerwowy. Może być stosowana w profilaktyce i wspomaganiu leczenia cukrzycy oraz otyłości. Suszone owoce lub liście morwy białej mogą stanowić żywność funkcjonalną, a ekstrakty z owoców, liści czy kory mogą wchodzić w jej skład. Na rynku produktów spożywczych i farmaceutycznych można spotkać suszone owoce, sok, herbaty ziołowe, suplementy diety oraz leki zawierające wyciągi z liści tej rośliny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 193 strony. W pracy wykorzystano 196 pozycji literaturowych, przy dominującym udziale publikacji anglojęzycznych, i jedno źródło internetowe; publikacje z okresu ostatnich 10-ciu lat stanowią około 68%. Autorka cytuje pięć publikacji, której jest współautorką.

Praca rozpoczyna się streszczeniem w języku polskim i angielskim, a następnie obejmuje dziesięć części: wstęp, przegląd literatury, cel i zakres badań, materiał badany, metody badań, wyniki i ich omówienie, dyskusja, obserwacje i wnioski. Całość kończy spis piśmiennictwa oraz wykazy tabel i rycin. Na początku pracy zamieszczono spis skrótów i symboli zastosowanych w pracy. W moim odczuciu rozdzielenie dyskusji i prezentacji wyników badań w tak obszernej pracy znacznie utrudnia analizę prezentowanych danych i obserwacji.

**Ocena merytoryczna pracy**

Mgr Monika Przeor w ramach dysertacji określiła wpływ zabiegów technologicznych przygotowania preparatów liści morwy białej odmiany Żółwińska Wielkolistna na zawartość wybranych związków biologicznie czynnych i właściwości przeciwutleniające tych preparatów. Zabiegi technologiczne obejmowały: stopień rozdrobnienia (liście całe, grube i drobno rozdrobnione), czas leżakowania (0, 1, 2, 3 i 4 h) i temperaturę suszenia (30°C, 60°C i 90°C). Z informacji zawartych w pracy wynika, że jak dotąd nie prowadzono badań, na ile warunki przygotowania surowca do suszenia mają wpływ na zawartość i właściwości bioaktywnych składników liści morwy białej, a etap leżakowania zastosowano po raz pierwszy. Badania były prowadzone w skali laboratoryjnej i półtechnicznej. Doktorantka scharakteryzowała liście świeże oraz poddane zabiegom technologicznym pod względem podstawowego składu chemicznego (sucha substancja, popiół, białko, tłuszcz i węglowodany). W preparatach liści grubo rozdrobnionych (skala laboratoryjna) oznaczyła zawartość 1,5-dideoksy-1,5-imino-D-mannitolu, fenolokwasów i flawonoli oraz zmierzyła aktywność przeciwutleniającą preparatów, stosując do tego celu pięć testów. W preparatach liści grubo rozdrobnionych otrzymanych w skali półtechnicznej oznaczyła dodatkowo skład aminokwasowy, profil kwasów tłuszczowych, zawartość podstawowych makro- i mikroelementów, błonnika pokarmowego, chlorofili (*a* i *b*) i kwasu askorbinowego oraz oceniła je sensorycznie. Konsumenckiej ocenie sensorycznej poddała również napary z tych preparatów. Ponadto, Doktorantka przeprowadziła symulację procesu trawienia preparatów

liściowych i naparów z liści morwy białej w warunkach *in vitro* w celu sprawdzenia wpływu leżakowania na przebieg procesu trawienia. Poszczególne etapy badań Autorka jasno przedstawiła na schemacie (ryc. 8, a nie 10, jak podała na str. 48). Ryc. 11 przedstawia schemat, który obrazuje zabiegi technologiczne liści morwy białej zastosowane w skali laboratoryjnej, natomiast ryc. 15 – schemat symulowanego procesu trawienia próbek w warunkach *in vitro*. Takie przedstawienie zaplanowanych badań bardzo ułatwia ocenę prawidłowości przyjętego planu pracy.

Studia literaturowe, stanowiące tło problemów poruszanych w badaniach własnych, zostały przedstawione na 29-ciu stronach maszynopisu. Autorka scharakteryzowała morwę białą i jej zastosowanie w medycynie. Omówiła modele przewodu pokarmowego stosowane w badaniach strawności i biodostępności składników odżywczych oraz przemiany i metabolizm polifenoli podczas trawienia. Ponadto, krótko przedstawiła, jak przetwarzanie surowców roślinnych wpływa na ich ogólną pojemność przeciwutleniającą.

Część doświadczalna jest bardzo obszerna (liczy 157 stron) i stanowi prezentację wyników realizacji zaplanowanych zadań badawczych i ich dyskusję. Otrzymane wyniki są przedstawione w 33 tabelach i na 61 wykresach (25 rysunkach). Prezentację uzyskanych wyników kończy rozdział *Obserwacje* oraz *Wnioski*.

Część doświadczalną rozpoczyna rozdział „Cel i zakres badań", w którym Doktorantka postawiła m.in. pięć hipotez badawczych. Hipoteza trzecia „Liście poddane leżakowaniu przez okres maksymalnie do czterech godzin wykazują zróżnicowaną zawartość polifenoli i aktywność przeciwutleniającą" jest zbędna, gdyż zawiera się w hipotezie pierwszej „Zabiegi rozdrabniania, leżakowania i suszenia liści morwy białej wpływają na zawartość i właściwości związków bioaktywnych". W hipotezie piątej Doktorantka podała „Trawienie w warunkach *in vitro*, zarówno preparatów z liści morwy białej, jak i ich naparów zachodzi według zbliżonego mechanizmu i charakteryzuje się zróżnicowanymi wskaźnikami przemiany cukrów i polifenoli". Jakie wskaźniki Doktorantka miała na myśli?

Część eksperymentalna nasunęła jeszcze kilka innych uwag i pytań.

**Metody badań**

1 W jakim przypadku Autorka pobierała 3 ml próbki w celu oznaczenia zawartości suchej substancji? (str. 65).

2 Biorąc po uwagę konieczność przetransportowania surowca z plantacji do laboratorium lub zakładu przetwórczego, od którego momentu liczono początek leżakowania?

3 Czy zastosowanie nawiewu suchego w temperaturze 60°C oraz termoobiegu w temperaturze 90°C nie spowodowało, że oprócz temperatury pojawił się dodatkowy czynnik różnicujący warunki suszenia w temperaturach 60°C i 90°C w stosunku do temperatury 30°C?

4 W ilu powtórzeniach wykonano zabiegi leżakowania czy suszenia próbek?

5 W ilu powtórzeniach wykonano poszczególne oznaczenia?

6 Jaką metodą wyznaczono LOD i LOQ oraz dokładność metod chromatograficznych?

7 W przypadku oznaczania kwasu askorbinowego, fenolokwasów i flawonoli błędnie podano, że LOD jest większy niż LOQ. Dlaczego dla fenolokwasów i flawonoli podano jedną wartość LOD i LOQ, przy czym Doktorantka oznaczała 10 fenolokwasów i 8 flawonoli.

8 Ile próbek do analizy pobierano na każdym etapie symulowanego procesu trawienia liści i naparów z liści morwy białej?

9 Str. 74-75. Opis analizy statystycznej uzyskanych wyników zawiera błąd. Doktorantka napisała, że „W celu określenia statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnimi wynikami w danym zestawieniu zastosowano porównania wielokrotne (testy *post-hoc*), a także jednoczynnikową lub dwuczynnikową analizę wariancji." Po pierwsze, najpierw wykonuje się analizę wariancji, a w przypadku stwierdzenia, że występują różnice pomiędzy porównywanymi średnimi bada się testami szczegółowymi, które dokładnie średnie różnią się (lub nie różnią) między sobą. Po drugie, Doktorantka powinna była zdecydować się na jeden test *post-hoc* (dla wyników o rozkładzie normalnym) i jeden test w przypadku próbek o rozkładzie nienormalnym, a nie stosować różne testy (wyniki w Tabeli 14). To samo dotyczy współczynnika korelacji w przypadku braku rozkładu normalnego (tabele 35, 37, 40, 42). Po trzecie, Doktorantka nie przedstawiła zestawienia wyników dwuczynnikowej analizy wariancji (wpływu poszczególnych czynników i ich interakcji).

**Wyniki**

*Uwagi ogólne*

1. Uważam, że porównywanie preparatów liściowych przygotowanych w skali laboratoryjnej i półtechnicznej z materiału roślinnego pochodzącego z różnych lat (w kontekście porównania obu skal) jest błędem. Doktorantka sama stwierdza, że warunki pogodowe mają wpływ na zawartość i właściwości związków bioaktywnych w surowcach roślinnych (str. 161). Wiele danych literaturowych wyraźnie wskazuje na zróżnicowanie roślin tej samej odmiany, uprawianych w tych samych warunkach agrotechnicznych, ale w różnych okresach w ciągu roku lub w różnych latach. Doktorantka powinna była wydzielić część materiału badanego z 2012 roku i przygotować z niego próbki w skali laboratoryjnej (takie same, jak w skali półtechnicznej) i prowadzić badania równolegle dla obu skal. Dopiero wówczas miałoby sens porównywanie obu skal i wyciąganie wniosków o wpływie skali przygotowania suszu na ilość i właściwości badanych składników morwy białej. W tym kontekście, poszukiwanie korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi dla różnego materiału roślinnego, przygotowanego w skali laboratoryjnej i półtechnicznej, jest również bezzasadne (str. 109). Również obserwacje i wnioski dotyczące tego aspektu pracy budzą uzasadnione wątpliwości.
2. Nie należy w pracy naukowej stosować określeń potocznych, np. „zmiatanie" rodników (raczej „unieczynnianie"). Dlaczego w przypadku $ABTS^{\bullet+}$ stosowano czasownik „hamowanie", a $DPPH^{\bullet}$ „zmiatanie"?
3. W przypadku obliczania współczynników korelacji powinna być podana (np. pod tabelą z wynikami) liczba wyników ujętych w obliczeniach.
4. Nie zostało wyjaśnione, dlaczego oprócz glukozy oznaczano w badanych próbkach ramnozę, arabinozę i rybozę.
5. Dlaczego nie oznaczano cukrów, fenolokwasów i flawonoli w próbkach na etapie „w jamie ustnej"?
6. W preparatach liści morwy białej, spośród fenolokwasów dominował kwas chlorogenowy i kawowy. Jak wytłumaczyć najwyższą zawartość kwasu galusowego na poszczególnych etapach symulowanego procesu trawienia liści i naparów?
7. Nie są dla mnie zrozumiałe korelacje (str. 135, Tabela 40 oraz str. 140, Tabela 42) pomiędzy zawartością niektórych fenolokwasów lub flawonoli a etapem trawienia

(co z czym korelowano?). Poza tym zawartość określonych związków nie może korelować z etapem trawienia. Zawartość związków może wzrastać lub maleć wraz z etapem trawienia. Co wynika z tych korelacji?

8. Jak była liczebność osób wykonujących konsumencką ocenę sensoryczną w podziale na płeć?
9. Czy w procesie trawienia liści i naparów pojawiły się jakieś dodatkowe metabolity flawonoli?
10. Nie ma potrzeby przedstawiania wyników z dokładnością do trzeciego miejsca po przecinku.
11. Skróty pochodzące z języka angielskiego powinny zawierać rozwiniecie w tym języku, wyjaśniające pochodzenie skrótu.
12. Nie widzę sensu pokazywania wzrostu lub spadku niektórych wartości skoro wyniki nie różnią się istotnie statystycznie. Oznaczenie ↑↓ spadek/wzrost" przy wynikach nieróżniących się od wyniku, w stosunku do którego są porównywane też budzi zastrzeżenia.
13. Doktorantka w całej pracy błędnie podaje zapis jednostek wyrażających aktywność przeciwutleniającą. Symbol M oznacza mol/dm$^3$, symbol mM oznacza mmol/dm$^3$ itd., zatem zapis mM/g, oznaczający mmol/dm$^3$/g, jest błędny.
14. W spisie skrótów i symboli brakuje takich skrótów, jak: TDF, SDF, IDF, FMOC-Cl. Skrót DNJ (1,5-dideoksy-1,5-imino-D-mannitol) w spisie odczynników to 1-deoxynojirimycin, co stanowi synonim 1,5-dideoksy-1,5-imino-D-sorbitolu.

*Uwagi szczegółowe*

1. Str. 76. Autorka podała, że w próbkach z 2012 r. było więcej węglowodanów niż w próbkach z 2011 r. o około 7% (z tabeli 11 wynika, że o 0,8% mniej).
2. Str. 77-78, Tabela 12. Przy ewentualnej publikacji wyników sugerowałabym wykonanie dwuczynnikowej analizy wariancji dla danego składnika odżywczego (czynniki: czas leżakowania i temperatura suszenia) i omówienie wyników w kontekście wpływu obu czynników na zawartość podstawowych składników odżywczych. Sposób przedstawienia wyników i brak ich szerszego omówienia w tekście sugeruje, że Doktorantka

przeprowadziła wyłącznie analizę wpływu czasu leżakowania próbek suszonych w danym wariancie temperaturowym.

3. Str. 80, Tabela 13. Dlaczego dla liści całych podano wyniki tylko dla próbek nieleżakowanych (0 h)? Ze schematu na ryc. 11 wynika, że dla każdego wariantu próbek (całe, drobno i grubo rozdrobnione liście) zastosowano warianty leżakowania 0, 1, 2, 3 i 4 h. Ponadto, dla liści drobno i grubo rozdrobnionych w tabeli oraz na ryc. 17 przedstawiono tylko wyniki po jednej i czterech godzinach leżakowania. Skoro nie pokazano wszystkich wyników, pozostałe powinny być zamieszczone np. w załączniku do pracy. Z Tabeli 13 wynika, że ogólna zawartość związków redukujących i aktywność preparatów liści względem DPPH$^{\bullet}$ była wysoka dla liści całych nieleżakowanych, suszonych w 30$^{o}$C. Skoro nie pokazano wyników dla wariantów leżakowanych nie ma możliwości sprawdzenia, czy rzeczywiści konieczne jest, z punktu widzenia ilości związków redukujących i aktywności przeciwutleniającej, rozdrabnianie liści przed suszeniem. Dobrze zaplanowane badania powinny obejmować układ kompletny (trzy czynniki: stopień rozdrobnienia liści, temperatura suszenia i czas leżakowania). Gdyby układ był kompletny, tzn. te same warianty leżakowania (dla liści całych jest tylko wariant „nieleżakowane") można by było zastosować trzyczynnikową analizę wariancji. Ponieważ w badaniach Doktorantki warunek ten nie był spełniony, powinien zostać zastosowany układ zagnieżdżony (hierarchiczny) ANOVA. Zastosowane oznaczenia w postaci dużych liter alfabetu oraz ich różnej liczby są zupełnie niezrozumiałe i niespotykane. Nie wiadomo, które wyniki nie różnią się istotnie. Z danych zawartych w tabeli wynika, że jest możliwość porównania wyłącznie próbek w obrębie wariantu liści „drobno" lub „grubo" rozdrobnionych lub pomiędzy tymi wariantami. Porównanie tych próbek z wariantem liści całych nieleżakowanych wymagałoby zastosowania nie testu Tukeya tylko Dunnetta z wydzieloną grupą kontrolną (próbki liści całych nieleżakowanych).
4. Str. 81, ryc. 16. Z podpisu pod rysunkiem nie wynika, że wyniki dotyczą tylko próbek nieleżakowanych.
5. Str. 85, Tabela 15. Powinna zawierać wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji (porównanie próbek nie tylko suszonych w różnej temperaturze, ale również leżakowanych w różnym czasie).

6. Str. 86, ryc. 18 i 19. Jak wyjaśnić najwyższe zawartości fenolokwasów i flawonoidów w próbkach suszonych w 60°C?
7. Str. 88 i 102. Analiza statystyczna może wykazać korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi w danych testach, a nie testami.
8. Tabela 17 i 27. Ujemne korelacje pomiędzy ogólną zawartością związków redukujących a zdolnością chelatowania jonów żelaza (Tabela 17) oraz pomiędzy ogólną zawartością związków redukujących a zdolnością zmiatania $ABTS^{\bullet+}$ (Tabela 27), chociaż statystycznie istotne, w świetle dotychczasowej wiedzy są nielogiczne.
9. Str. 91, Tabela 19. Stosunek aminokwasów egzogennych do endogennych powinien być wielkością niemianowaną (tu %). Nie jest jasne, co przedstawiają podane wartości.
10. Str. 95, Tabela 21. Jak wyjaśnić znaczne wahania zawartości Na i Fe w preparatach liściowych otrzymanych w skali półtechnicznej? Czy takie zmiany są w ogóle możliwe?
11. Str. 99, Tabela 24. Doktorantka w dyskusji wyników próbuje wyjaśnić wzrost zawartości chlorofili w próbkach leżakowanych przez 3 i 4 h. Jak natomiast wytłumaczyć gwałtowne obniżenie zawartości chlorofili w próbkach leżakowanych przez 2 h, a następnie ponowny wzrost tych związków po 3 i 4 godzinach leżakowania?
12. Tabele 19, 24, 28, 29, 34, 36, 41 zawierają sumy zawartości oznaczanej grupy związków wyliczone przez sumowanie średnich wyników dla poszczególnych związków. Przy ewentualnej publikacji wyników sugeruję policzenie sumy związków dla poszczególnych próbek w danym oznaczeniu i wyliczenie średniej wraz z odchyleniem standardowych dla danego preparatu liściowego/etapu trawienia.
13. Str. 123-126. Podrozdział 7.5. dotyczy sensorycznej oceny konsumenckiej, a nie typowo sensorycznej, jak podaje Doktorantka. Odchylenia standardowe uzyskanych wyników sensorycznej oceny konsumenckiej sugerują brak wpływu czasu leżakowania liści na ocenę pożądalności poszczególnych cech jakościowych naparów. W tym kontekście wybór najlepszego wariantu jest dyskusyjny.

**Dyskusja, Obserwacje i Wnioski**

W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka omawia wszystkie uzyskane wyniki i porównuje je z danymi literaturowymi, ale nie zawsze podejmuje próbę wyjaśnienia stwierdzonych różnic pomiędzy badanymi preparatami. Stwierdzenia zawarte w rozdziale *Obserwacje* mają raczej charakter wniosków i mogłyby stanowić całość wraz z wnioskami. W kontekście uwagi

dotyczącej porównywania skali laboratoryjnej i półtechnicznej przygotowania suszu liści morwy białej nie zgadzam się z pewnymi stwierdzeniami dotyczącymi tego porównania, które znalazły się w *Dyskusji*, *Obserwacjach* i *Wnioskach*. To samo dotyczy niezrozumiałych dla mnie korelacji pomiędzy zawartością poszczególnych związków a etapem trawienia.

Praca została napisana starannym i zwięzłym językiem naukowym, zawiera nieliczne błędy językowe oraz „skróty myślowe", których nie przytaczam. Nieco więcej jest błędów interpunkcyjnych oraz błędów redakcyjnych, np. tzw. „zlepki literowe" (200mg zamiast 200 mg) i pojedyncze litery na końcu wiersza. Błędy te nie obniżają wartości merytorycznej pracy.

Uwagi przedstawione powyżej nie mają wpływu na pozytywną ogólną ocenę merytoryczną pracy. Mgr inż. Monika Teresa Przeor wykazała się znajomością tematu i metod analitycznych umożliwiających realizację celów pracy oraz umiejętnością analizy i interpretacji wyników. Badania zostały wykonane z wykorzystaniem odpowiednich technik i metod analitycznych, dużym nakładem pracy, co należy podkreślić. Oryginalność pracy polega na wykazaniu, że pewne zabiegi technologiczne, np. leżakowanie do dwóch godzin, mogą pozytywnie wpłynąć na zawartość i właściwości związków obecnych w liściach morwy białej. Badania mają charakter aplikacyjny, a ich wyniki mogą być wykorzystane w projektowaniu żywności funkcjonalnej na bazie liści tej rośliny. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są wartościowe i stanowią istotny wkład w badania dotyczące wpływu różnych czynników na surowce roślinne o właściwościach prozdrowotnych.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji dysertacja spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki, Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Teresy Przeor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Gwiazdowska-Świgło

Poznań, dnia 20 października 2017 r.