

Dr hab. inż. Hanna Staroszczyk
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

Gdańsk, 10 września 2019

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Sebastiana Balickiego
pt. „Otrzymywanie polifenolowo-polisacharydowych koniugatów pochodzenia roślinnego
o potencjale prozdrowotnym wspomagane wybranymi czynnikami fizycznymi”

Praca została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej (WCh PWr) pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Romana Gancarza. Promotorem pomocniczym była dr inż. Izabela Pawlaczyk-Graja.

Na przestrzeni kilkunastu ostatnich lat rośnie zainteresowanie substancjami biologicznie aktywnymi pochodzenia roślinnego, co spowodowane jest m.in. niewystarczającą skutecznością tradycyjnych leków chemicznych w leczeniu wielu chorób. Pomimo, że badania nad wydzielaniem takich substancji prowadzone są intensywnie w wielu ośrodkach naukowych, w tym również w Zespole prof. Romana Gancarza z Zakładu Technologii Organicznej i Farmaceutycznej WCh PWr, to technologie wykorzystywane w metodach otrzymywania tych związków wciąż wymagają ulepszenia, by produkt atrakcyjny pod względem aktywności biologicznej otrzymać z dużą wydajnością i przy małych nakładach energetycznych. Z tego względu, podjęcie przez mgr. inż. Sebastiana Balickiego badań nad modyfikacją i optymalizacją opracowanego wcześniej przez Zespół prof. Romana Gancarza procesu pozyskiwania glikokoniugatów polifenolowych z przymiotna kanadyjskiego o właściwościach antykoagulacyjnych względem osocza krwi ludzkiej, uważam za cenne i uzasadnione, zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Badania te zostały częściowo zrealizowane w ramach dotacji projakościowej Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego na WCh PWr oraz dzięki współpracy z Zakładem Glikomateriałów Instytutu Chemii Słowackiej Akademii Nauk w Bratysławie.

Przedłożona praca liczy 140 stron tekstu, w którym jest 39 tabel i 67 rycin, ponadto zawiera załączniki w postaci 5 dodatkowych tabel. Część teoretyczna, obejmująca stronę tytułową, stronę z informacją o dotacji na badania opisane w rozprawie i współpracy podjętej w trakcie jej realizacji, podziękowania, spis treści, wykaz stosowanych skrótów i symboli,

wprowadzenie i przegląd literatury, zakończona jasno sformułowanym celem pracy, zajmuje 51 stron. W części eksperymentalnej, materiał badawczy, postępowanie doświadczalne wraz z omówieniem i dyskusją wyników zajmują 62 strony. Pracę kończy podsumowanie, zawarte na 4 stronach, po którym opisane są materiały i metody – 14 stron, oraz spis literatury liczący 335 pozycji, w większości anglojęzycznych z ostatnich 10 lat – 8 stron. Na końcu rozprawy znalazło się interesujące zestawienie najważniejszych osiągnięć Pana Sebastiana Balickiego.

W części teoretycznej rozprawy, Doktorant, korzystając z bogatego piśmiennictwa, opisał polisacharydy pochodzenia roślinnego i ich glikokoniugaty wchodzące w skład budowy ściany komórkowej roślin, ze szczególnym uwzględnieniem terapeutycznego potencjału koniugatów polifenolowo-polisacharydowych, w tym ich aktywność antykoagulacyjną. Niektóre fragmenty tej części pracy, w szczególności te dotyczące charakterystyki polisacharydów roślinnych, zawierają głównie materiał podręcznikowy. Dlatego lepiej byłoby, gdyby choć rysunki obrazujące formy przestrzenne polisacharydów Doktorant sporządził według własnego pomysłu, zamiast korzystać z materiałów wcześniej opublikowanych. Następnie omówił metody wyodrębniania tego typu związków różnymi metodami ekstrakcyjnymi, rozpoczynając od metod tradycyjnie stosowanych, a kończąc na metodach wspomaganych czynnikami fizycznymi, tj. ultradźwiękami i mikrofalami, podkreślając zarówno ich zalety, jak i wady. Kolejne rozdziały zawierają szczegółową analizę zagadnienia związanego z planowaniem i optymalizacją eksperymentów nowoczesnymi metodami obliczeniowymi, poczynając od zagadnień ogólnych, a skończywszy na najważniejszych modelach optymalizacyjnych, tradycyjnych oraz wykorzystujących metodologię powierzchni odpowiedzi, w tym plany centralne kompozycyjne (z ang. *Central Composite Design*, CCD), metodę Box'a-Behnken'a oraz modele planowania optymalnego (m.in. plany *I*- i *D*-optymalne). Interesujące jest zestawienie stosowanych technik optymalizacyjnych w projektowaniu procesów w różnych obszarach nauki, które przedstawiono w tabeli 6. Wskazuje ono, że najczęściej stosowanymi modelami optymalizacyjnymi są CCD oraz metoda Box'a-Behnken'a.

Część teoretyczna jest ciekawa i dobrze wprowadza w tematykę pracy doktorskiej. Zabrakło jednak streszczenia, które odzwierciedliłoby dokładnie treść pracy doktorskiej i zawierało ostateczną konkluzję. Korzystne byłoby również umieszczenie zakończenia tej części pracy w postaci zwięzłego i treściwego podsumowania. W pracy nie przestrzegano ogólnie obowiązującej zasady jednokrotnego objaśniania stosowanych akronimów przy pierwszym użyciu w tekście oraz konsekwentnego ich stosowania w dalszej części pracy, np. str. 28¹¹ i 34₉, str. 34² i str. 35¹⁰, str. 35₇ i 45³. Układ pracy byłby też bardziej czytelny, gdyby

tekst poszczególnych rozdziałów rozdzielono podtytułami w systemie dziesiętnym – bezpośrednio po tytule rozdziału nie powinno być tekstu nie przyporządkowanego podtytułowi. Proponowałabym więc, np.

1. Polisacharydy pochodzenia roślinnego

1.1. *Uwagi ogólne* lub po prostu *Wprowadzenie*

1.2. Podział polisacharydów na homogliki i heterogliki.

Wśród usterek, które zauważyłam w rozdziale 3.3.2 są dwa rysunki o tym samym numerze (Rys. 3.3.2.1), natomiast w rozdziale 4.3 zabrakło podrozdziałów o numerach 4.3.1 oraz 4.3.2.

Część teoretyczną kończy jasno sformułowany cel pracy oraz ściśle określone zadania, których realizacja miała doprowadzić do osiągnięcia tego celu. Zostały one dobrze zaplanowane.

W części eksperymentalnej Pan Sebastian Balicki przedstawił poszczególne etapy postępowania doświadczalnego oraz opisał metodykę badawczą i metody analityczne w sposób umożliwiający odtworzenie eksperymentów. Aby zrealizować zaplanowane zadania opanował szereg zróżnicowanych metod badawczych z zakresu chemii analitycznej, fizykochemii i biologii. W pierwszej kolejności Doktorant określił podstawowe właściwości fizyczne suchego surowca roślinnego tj. ziela przymiotna kanadyjskiego, po czym wykonał szereg ekstrakcji, początkowo konwencjonalnej na zimno i na gorąco, a następnie wspomaganej ultradźwiękami i mikrofalami w zmiennych warunkach procesowych (mocy czynników fizycznych, czasu i temperatury ekstrakcji). Otrzymane surowe ekstrakty poddał analizie, a uzyskane parametry, tj. wydajność procesu, pH wodnego roztworu oraz aktywność antykoagulacyjną, użył do optymalizacji procesu ekstrakcji wspomaganej, wykorzystując specjalistyczne oprogramowanie oraz model optymalizacyjny *I*-optymalny. Wydajność obu procesów wspomaganych oraz aktywność biologiczna otrzymanych surowych ekstraktów były na poziomie zbliżonym lub wyższym do wartości uzyskanych w procesie konwencjonalnym, ale czas ekstrakcji uległ znacznemu skróceniu, z 6 godz. w procesie konwencjonalnym do 60 i 20 min w procesie wspomaganym, odpowiednio, ultradźwiękami i mikrofalami. Po wieloetapowym procesie oczyszczania Doktorant sprawdził ponownie aktywność antykoagulacyjną ekstraktów, a następnie wybrane z nich poddał szczegółowej charakterystyce chemicznej i biologicznej. Uzyskane preparaty okazały się zróżnicowane pod względem masy cząsteczkowej, dlatego Doktorant poddał je frakcjonowaniu, wskutek czego uzyskał atrakcyjne bioprodukty o swoistym oddziaływaniu z antytrombiną.

Wyniki licznych badań, zestawione w przejrzystości opracowanych tabelach i rysunkach, Doktorant szczegółowo, rzeczowo i krytycznie przedyskutował, odnosząc się do danych

zawartych w dostępnym piśmiennictwie. W oparciu o te dane oraz wykorzystując wyniki wcześniej otrzymane przez Zespół, opracował metodę otrzymywania bioproduktu o aktywności antykoagulacyjnej. Poniżej przedstawiam kilka pytań i komentarzy, które nasunęły mi się podczas czytania tej części rozprawy.

Spośród ekstraktów z przymiotna kanadyjskiego, które zwiększyły aktywność antykoagulacyjną po procesie oczyszczenia, tj. w przypadku ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami produkt U4 uzyskany w warunkach 30 W, 25°C, 60 min, a w przypadku ekstrakcji wspomaganą mikrofalami dwa produkty, M1 i M4, otrzymane w warunkach, odpowiednio, 300 W, 80°C, 20 min i 100 W, 50°C, 20 min, do dalszej analizy chemicznej i biologicznej wybrano ekstrakty **U4 i M1**. Czy w tym drugim przypadku nie należało wybrać ekstraktu **M4 zamiast M1**? Wykazywał on aktywność antykoagulacyjną tylko ok. 9% mniejszą od tej wykazywanej przez produkt M1, a uzyskano go w warunkach bardziej korzystnych energetycznie (przy mniejszym zużyciu energii i niższej temperaturze). Tym bardziej, że, temperatura ekstrakcji otrzymywania produktu M1, 80°C, była temperaturą pośrednią pomiędzy 70 i 95°C, przy której otrzymano produkty, odpowiednio, M2 i M3, o aktywności antykoagulacyjnej mniejszej od aktywności surowych, nieoczyszczonych ekstraktów. Zastanawiam się również czy podane na str. 64¹ wyrażenie '*plik wsadowy*' jest poprawnie użyte; '*input file*' to nie jest po polsku '*plik wsadowy*' (czyli po ang. *batch file*), tylko '*plik wejściowy*', a lepiej chyba '*plik z danymi do programu*'. Na str. 56⁵⁻⁶ podano, że wyznaczony średni wymiar cząstki suchego materiału roślinnego wynosił $1,63 \pm 1,05$ mm. Czy pomiar ten wnosi jakąś istotną informację, skoro odchylenie standardowe przekracza 60%? Na tej samej stronie w 11 linii od góry błędnie podano wartości wskaźników różnoziarnistości i krzywizny dla materiału jednofrakcyjnego, jako, odpowiednio, > 6 i > 1 (w rzeczywistości powinny one być < 6 i < 1). Str. 60₂ zamiast '*w Tabeli Z.2*' powinno być '*w Tabeli Z.1*'. Na rysunkach 7.2.2 i 8.2.2 umieszczonych na stronach 65 i 83, przedstawiono rozkład danych rzeczywistych oraz wyliczonych przez model optymalizacyjny planu *I*-optymalnego dla zmiennych zależnych w procesach ekstrakcji wspomaganą, ale zabrakło do nich legendy, z której wynikałoby co oznaczają użyte na wykresach kolory. Rysunek 3.2.6 na str. 70 to tak naprawdę rysunek 7.2.6. Symbole ECM.9S, ECM.64S, ECM.34S i ECM.59S podane na str. 87₃₋₄ i str. 115₁₈ oraz ECU.13S, ECU.14S, ECU.15S i ECU.16S podane na str. 115₂₁ nie znalazły się w spisie symboli znajdujących się na str. 8. Zdanie umieszczone na str. 101¹⁴⁻¹⁸ jest niezrozumiałe. Zabrakło podpisu osi odciętych na rys. 9.1.6.1 zamieszczonym na str. 106.

Pracę kończy podsumowanie, które przedstawia po raz kolejny cel pracy oraz streszczenie opisanych wcześniej obserwacji. Jest ono bardzo obszerne, z licznymi i zbędnymi powtórzeniami. Sugerowałabym, aby podczas publicznej obrony pracy Doktorant ograniczył się tylko do kilku rzeczywistych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań.

W konkluzji stwierdzam, że Pan Sebastian Balicki, realizując cele badawcze rozprawy, wykazał się dużą wiedzą, głównie z zakresu (a) budowy, właściwości oraz sposobów wyodrębniania polisacharydów roślinnych i ich koniugatów, (b) nowoczesnych metod obliczeniowych stosowanych przy projektowaniu i optymalizacji eksperymentów, (c) tradycyjnych i nowoczesnych metod instrumentalnych w analizie chemicznej, w tym metod spektroskopowych: UV-VIS, w podczerwieni (FT-IR) i magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR, ^{13}C HSQC) oraz metod chromatograficznych: gazowej ze spektroskopią mas (GC-MS) i wykluczania (SEC), (d) testów oceniających właściwości biologiczne preparatów roślinnych, w tym diagnostycznego testu aPTT *in vitro* oraz sprawdzających oddziaływania tych preparatów z wybranymi białkami kaskady krzepnięcia. Wykazał się również umiejętnością poprawnej interpretacji wyników badań doświadczalnych i znajdowania między nimi związków przyczynowo-skutkowych. Wyniki te doprowadziły do opracowania skutecznej, mniej kosztownej od dotychczas stosowanej, metody ekstrakcji polifenolowo-polisacharydowych koniugatów z przymiotna kanadyjskiego o właściwościach prozdrowotnych, dlatego też stanowią oryginalny i istotny wkład Doktoranta w rozwój technologii chemicznej. Tym samym Pan mgr inż. Sebastian Balicki spełnił ustawowe wymagania dotyczące rozpraw doktorskich. Wniosuję zatem o dopuszczenie Go do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny i bardzo szeroki zakres pracy doświadczalnej, w tym mnogość użytych metod analitycznych, a także znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników, przedstawiam Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. inż. Sebastiana Balickiego.

