

Toruń, 26.09.2019 r.

dr hab. Magdalena Ligor, prof. UMK
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky
Wydział Chemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Sebastiana Balickiego,
pt. „Otrzymywanie polifenolowo-polisacharydowych koniugatów pochodzenia roślinnego
o potencjale prozdrowotnym wspomagane wybranymi czynnikami fizycznymi”
wykonanej pod kierunkiem:
prof. zw. dr. hab. inż. Romana Gancarza i dr inż. Izabeli Pawlaczyk-Graja
w Zakładzie Technologii Organicznej i Farmaceutycznej, Wydział Chemiczny,
Politechnika Wroclawska**

Rozprawa doktorska magistra inżyniera Sebastiana Balickiego poświęcona jest wyodrębnianiu polifenolowo-polisacharydowych koniugatów z przymiotna kanadyjskiego (*Erigeron canadensis* L.), poprzez zastosowanie właściwych metod ekstrakcji, wspomaganych czynnikami fizycznymi takimi jak ultradźwięki oraz promieniowanie mikrofalowe. Będące w sferze zainteresowania Autora bioprodukty z przymiotna kanadyjskiego, posiadają udowodnioną aktywność antykoagulacyjną. Głównym założeniem przeprowadzonych prac badawczych było zmodyfikowanie i zoptymalizowanie metody pozyskiwania glikokoniugatów polifenolowych, poprzez przeprowadzenie szeregu ekstrakcji wspomaganych ultradźwiękami lub mikrofalami w zmiennych warunkach, a następnie wyznaczenie warunków optymalnych. Celem optymalizacji była w głównej mierze poprawa wydajności ekstrakcji, a w konsekwencji zwiększenie aktywności antykoagulacyjnej bioproduktów pozyskanych z przymiotna kanadyjskiego. Uzyskane surowe ekstrakty były poddawane wieloetapowemu oczyszczaniu, według znanej procedury, opracowanej przez pracowników Zakładu Technologii Organicznej i Farmaceutycznej, WCh, PWr. Z kolei oczyszczone bioprodukty były poddane szczegółowym analizom, aby skorelować sposób otrzymywania ekstraktów z ich charakterem chemicznym i aktywnością biologiczną, w tym mechanizmami działania antykoagulacyjnego. Oczyszczone bioprodukty, pozyskane z przymiotna kanadyjskiego w optymalnych warunkach ekstrakcji, wspomaganej

ultradźwiękami lub mikrofalami, były frakcjonowane przy użyciu chromatografii cieczowej wykluczenia, co umożliwiło uzyskanie koniugatu polifenolowo-polisacharydowego, o wysokim stopniu czystości oraz potencjalnym selektywnym mechanizmie działania. Przeprowadzono szczegółową charakterystykę chemiczną pozyskanych koniugatów, z wykorzystaniem nowoczesnych technik analitycznych (GC/MS, FT-IR, NMR). Uwzględniono również mechanizm działania, który warunkuje aktywność biologiczną koniugatu polifenolowo-polisacharydowego. W tym miejscu należy zaznaczyć, że Autor pracy przedstawił opracowane metodyki (wyniki oraz komentarze), w sposób staranny i przejrzysty. Opracowanie wyników poparte jest stosownymi wnioskami i szczegółowymi komentarzami. Recenzowana rozprawa doktorska ma istotne znaczenie w kontekście opracowania skutecznych metodyk wyodrębniania i oznaczania związków biologicznie aktywnych w materiale roślinnym.

Licząca 148 stron praca doktorska posiada układ klasyczny dla tego typu opracowań. Składa się z 14 rozdziałów - wstęp teoretyczny (rozdziały od 1 do 4), cele pracy, część eksperymentalna wraz z wynikami i ich omówieniem, podsumowanie oraz materiały i metody. Rozprawa zawiera również wykaz literatury (w liczbie 335 pozycji) oraz załączniki (tabele z wynikami). W rozprawie przedstawiono w sumie 46 tabel oraz 65 rysunków. Godnym uznania jest bardzo staranne ich przygotowanie. Osiągnięcia naukowe mgr. inż. Balickiego zostały przedstawione w osobnym rozdziale. W skład rozprawy wchodzi także wykaz skrótów i akronimów. Autor zastosował pojedynczy odstęp między wierszami, a mimo to praca jest dość obszerna. Rozprawa jest starannie przygotowana pod względem redakcyjnym i napisana poprawnie językowo. Pewne zastrzeżenia budzi interpunkcja, drobne błędy edytorskie i pojawiające się w pracy powtórzenia. Rozprawa zawiera wiele odniesień do osoby Autora, co sprawia że dysertacja jest swego rodzaju zbiorem własnych przemyśleń. Jest to sposób dość rzadko stosowany w opracowaniach naukowych, powinno się raczej stosować formę bezosobową. Uwagę zwraca również zbyt obszerne podsumowanie, w którym zdaniem recenzenta, powinno się zamieszczać tylko najważniejsze, najistotniejsze osiągnięcia i wnioski z przeprowadzonych badań. Niestety niefortunne jest także zamieszczenie rozdziału materiały i metody na końcu pracy, te informacje powinny poprzedzać wyniki i ich omówienie, co jest konieczne w zachowaniu ciągłości omawianych metodyk. Wystąpił również błąd w numeracji tabel, nr 28 pojawia się dwukrotnie.

Część teoretyczna jest zwięzłym wprowadzeniem do tematyki badawczej. Mgr inż. Balicki scharakteryzował polisacharydy pochodzenia roślinnego, przedstawił koniugaty tych

związków z innymi substancjami, wśród których wymienić można glikokoniugaty polifenolowe. Autor odniósł się do prozdrowotnych właściwości koniugatów polifenolowo-polisacharydowych. W osobnym rozdziale zostały omówione metody wyodrębniania polisacharydów i ich koniugatów z matryc roślinnych, z uwzględnieniem czynników wpływających na wydajność ekstrakcji - rodzaj rozpuszczalnika, temperatura, czas oraz wpływ innych czynników fizycznych, tj. ultradźwięki oraz promieniowanie mikrofalowe. Interesujący jest rozdział poświęcony projektowaniu i optymalizacji eksperymentów. Autor dokonał szczegółowego przeglądu modeli optymalizacyjnych, uwzględniając modele tradycyjne oraz modele wykorzystujące metodologię powierzchni odpowiedzi.

Cele pracy zostały przedstawione w sposób zwięzły i wyczerpujący, a dotyczą w głównej mierze:

- zmodyfikowania i zoptymalizowania metody pozyskiwania glikokoniugatów polifenolowych z przymiotna kanadyjskiego, która polega na ekstrakcji, prowadzonej w wielu wariantach, wspomaganiej ultradźwiękami i promieniowaniem mikrofalowym;
- wieloetapowego oczyszczania surowych ekstraktów;
- analiz otrzymanych bioproduktów (ekstraktów), aby skorelować sposób otrzymywania z charakterem chemicznym i aktywnością biologiczną, a przede wszystkim mechanizmem działania antykoagulacyjnego;
- frakcjonowania oczyszczonych bioproduktów przy użyciu chromatografii cieczowej wykluczania i uzyskania koniugatu polifenolowo-polisacharydowego o wysokim stopniu czystości i selektywnym mechanizmie działania.

Na 80 stronach części doświadczalnej przedstawiono informacje dotyczące materiału badawczego, którym było przymiotno kanadyjskie (konyza kanadyjska) - roślina z rodziny astrowatych, mająca zastosowania medyczne. Autor przedstawił wyniki analizy sitowej materiału roślinnego przeznaczonego do badań. W dalszej części omówiono konwencjonalne sposoby otrzymywania ekstraktów z badanego surowca, z uwzględnieniem wydajności ekstrakcji, pH ekstraktów i aktywności antykoagulacyjnej. Dalej zaproponowano modyfikację metody ekstrakcji w układzie ciało stałe - ciecz w środowisku wodnym o zmiennym pH, poprzez kontrolowane wspomaganie ultradźwiękami, w określonych przedziałach czasowych. Uzyskane wyniki posłużyły do statystycznej analizy danych prowadzącej do optymalizacji zaproponowanej metody (testy ANOVA, modele wykorzystujące metodologię powierzchni odpowiedzi, wyznaczenia wartości poszczególnych zmiennych niezależnych). Dalsze postępowanie dotyczyło metody ekstrakcji wspomaganiej promieniowaniem mikrofalowym. Autor zaproponował tok postępowania uwzględniający moc promieniowania, temperaturę i czas. Do statystycznej analizy danych, konieczne było wyznaczenie takich parametrów jak

wydajność ekstrakcji, pH, aktywność antykoagulacyjna. Kolejnym etapem było oczyszczenie wyselekcjonowanych ekstraktów z przymiotna kanadyjskiego. Dalsza część pracy dotyczy szczegółowej charakterystyki bioproduktów pod względem składu chemicznego jak i aktywności biologicznej. Część badań dotyczyła aktywności antykoagulacyjnej oczyszczonych bioproduktów. Natomiast analiza jakościowa i ilościowa została wykonana pod kątem zawartości cukrów, kwasów uronowych, polifenoli i białek. Analiza jakościowa bioproduktów wymagała zastosowania technik chromatograficznych, ale także spektroskopowych (FT-IR, NMR). W osobnym rozdziale Autor przedstawił rozważania na temat mechanizmu aktywności antykoagulacyjnej (badania *in vitro*). W obszernym podsumowaniu (rozdział 10) p. mgr inż. Sebastian Balicki omówił wyniki swoich badań.

Mgr inż. Sebastian Balicki jest współautorem 5 publikacji, które dotyczą zagadnień związanych z przedmiotem rozprawy doktorskiej. Sumaryczna wartość współczynnika **IF wynosi 11,489**, a suma punktów wg wykazu MNiSW wynosi 235, co w wypadku osób ubiegających się o stopień naukowy doktora jest wynikiem bardzo dobrym.

Podjęta przez Doktoranta problematyka, wpisuje się w aktualne tematy badawcze związane poszukiwaniem surowców roślinnych, bogatych w składniki biologicznie aktywne, w tym wypadku koniugaty polifenolowo-polisachrydowego o wysokiej aktywności antykoagulacyjnej. Oceniając pracę doktorską należy również podkreślić, że wymagała ona wykonywania licznych eksperymentów, mających na celu wyznaczenie odpowiednich warunków ekstrakcji i oczyszczania oraz wykonania badań *in vitro*. Doktorant przeprowadził wiele czasochłonnnych i żmudnych doświadczeń, mających na celu doskonalenie metod ekstrakcji. Wykazał się zatem umiejętnościami planowania i wykonywania eksperymentów oraz interpretacji wyników.

Dokonując oceny rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne uwagi oraz spostrzeżenia do rozważania i dyskusji:

- str. 10 - krótkiego wyjaśnienia wymaga znaczenie anomerów;
- str. 11 - proszę rozwinąć sformułowanie „oscylacja względem kątów torsyjnych” i odnieść się do podpisu pod rysunkiem 1.2.3;
- str. 13, tabela nr 1 - zamiast stopień rozpuszczalności można było napisać rozpuszczalność w wodzie;
- str. 17 - proszę rozwinąć „Oba rodzaje sieciowania wpływają na stopień usztywnienia materii ściany komórkowej.” ;
- str. 19 - wykorzystanie oligosacharydów w systemach obronnych roślin, wobec jakich związków (patogenów);

- str. 26 i dalej - brakuje przykładowych wyników (temperatura, czas ekstrakcji), porównanie byłoby cennym uzupełnieniem;
- str. 53 - surowiec z lokalnego rynku - czyli skąd pochodził?
- str. 53 - gęstość usypowa, częściej stosuje się termin gęstość nasypowa;
- str. 90 - można było napisać w postaci proszku zamiast „sproszkowanego ciała stałego o drobnej pyłacej strukturze”;
- str. 91 - z czego wynika brak niektórych danych w tabeli nr 31?
- str. str. 93 - czy rozważano wykorzystanie również techniki LC/MS w określaniu składu jakościowego i ilościowego badanych ekstraktów?
- str. 93 - proszę rozwinąć i wyjaśnić sformułowanie: analiza „techniką GC/MS w postaci rozdziału odhydrolizowanej części cukrowej izolatów, zderywatyzowanych w lotne pochodne”;
- str. 96 - proszę rozwinąć: „krzywa kalibracyjna mas cząsteczkowych w funkcji objętości”;
- str. 99 - w tabeli 33 pojawiają się ponownie wyniki z tabeli nr 31;
- str. 103 i dalej - czy konieczne było zamieszczenie rysunków 9.1.5.2 i 9.1.5.3?
- w rozdziale 12. Literatura - mogłyby się pojawić tytuły artykułów, ale ich brak jest zrozumiały ze względu na liczbę cytowanych prac.

Podsumowując chciałabym podkreślić, że praca doktorska p. mgr. inż. Sebastiana Balickiego zawiera elementy nowości naukowej. Doktorant osiągnął cele pod względem metodycznym. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Sebastiana Balickiego pt. *„Otrzymywanie polifenolowo-polisacharydowych koniugatów pochodzenia roślinnego o potencjale prozdrowotnym wspomagane wybranymi czynnikami fizycznymi”*, spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach i tytule naukowym oraz stopniach w zakresie sztuki”.

Wnoszę zatem do Rady Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej, o dopuszczenie p. mgr inż. Sebastiana Balickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego o nadanie tytułu doktora nauk chemicznych, w dyscyplinie technologia chemiczna. Jednocześnie ze względu na znaczące zaangażowanie Doktoranta w pracę badawczą oraz wysoką wartość uzyskanych wyników, pragnę rekomendować niniejszą rozprawę doktorską do wyróżnienia.

Magdalena Lijer