



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI

prof. dr hab. inż. Aneta Wojdyło

Wrocław, 1.09.2023r.

Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Nutraceutyków Roślinnych

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pani mgr inż. Urszuli Trych

pt.: „Wpływ wysokich ciśnień na biodostępność
antyoksydantów owoców i warzyw”

wykonanej pod kierunkiem

promotora dr hab. inż. Krystiana Marszałka, prof. IBPRS-PIB

oraz promotora pomocniczego dr inż. Magdaleny Buniowskiej-Olejnik

Podstawą przygotowania recenzji było pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej IBPRS-PIB prof. dr hab. Zbigniewa J. Dolatowskiego z dnia 10.07.2023r., zgodnie z uchwałą Rady Naukowej IBPRS-PIB z dnia 11.12.2019r.

Uzasadnienie wyboru tematu i jego znaczenie

Owoce i warzywa, w szczególności te rodzime, to surowce roślinne zasobne w związki o właściwościach przeciwutleniających, do których zaliczamy głównie związki polifenolowe oraz witaminy. Związki te charakteryzują się szeregiem właściwości prozdrowotnych przez co powinny regularnie być dostarczane do organizmu w jak największej ilości, gdyż zapewniają jego pełną homeostazę. Niemniej jednak dostarczanie składników o tych właściwościach nie jest jednoznaczne z tym, że zostaną one w pełni przyswojone i wykorzystane przez organizm ludzki. Dlatego kluczowe jest zdobycie wiedzy na temat biodostępności i bioprzyswajalności tych składników dla organizmu ludzkiego. Dodatkowo, już na początkowym etapie produkcji żywności należy zapewnić jak najwyższą retencję składników bioaktywnych, wysoką jakość produktów przy jednoczesnym zachowaniu bezpieczeństwa i przedłużonej przydatności do spożycia. Stąd coraz większą popularnością obdarzane się techniki niekonwencjonalnego utrwalania produktów, w tym technika wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) oraz ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym



EXCELLENCE IN RESEARCH

UNIwersytet PRZYRODNICZY WE WROCLAWIU
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI
ul. Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław
tel. 71 320 77 06
www.upwr.edu.pl



(SCCD), w których kluczową rolę jest dobór odpowiednich parametrów procesu w zależności od surowca i typu produktu oraz efektu końcowego jaki zamierzamy uzyskać.

Ponadto w literaturze przedmiotu istnieje niewielka ilość doniesień określających wpływ niekonwencjonalnych technik obróbki i utrwalania na biodostępność i bioprzyswajalność związków polifenolowych, betalain i witamin, w tym witaminy C.

Stąd przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Urszuli Trych pt.: „Wpływ wysokich ciśnień na biodostępność antyoksydantów owoców i warzyw” poddaje pod rozważania problematykę istotną, gdyż podnoszone kwestie biodostępności i bioprzyswajalności oraz wpływu nowych technik utrwalania na te procesy dotychczas nie były w dostatecznym stopniu poddawane rozważaniom przez co obecnie w znaczącej mierze nurtują wielu badaczy wpisując się w najaktualniejsze trendy badawcze.

Ocena formalna dysertacji

Przedstawiona do recenzji dysertacja mgr inż. Urszuli Trych oparta jest o cykl czterech, spójnych tematycznie publikacji zebranych pod wspólnym tytułem: „Wpływ wysokich ciśnień na biodostępność antyoksydantów owoców i warzyw”, w skład której wchodzi 1 rozdział książki wydanej przez wydawnictwo Elsevier oraz 3 publikacje z wydawnictwa MDPI:

- publikacja 1: Trych U., Bunikowska M., Skąpska S., Zhu Z, Bi J., Liu X., Barba F.J., Marszałek K. *Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing. Present and Future of High Pressure Processing: A Tool for Developing Innovative, Sustainable, Safe and Healthy Foods, ELSEVIER, 2020, 87–109*

- publikacja 2: Trych U., Bunikowska M., Skąpska S., Starzonek S., Marszałek K. *The bioaccessibility of antioxidants in black currant puree after high hydrostatic pressure treatment. Molecules, 2020, 25(15), 3544*

- publikacja 3: Trych U., Bunikowska M., Skąpska S., Kapusta I., Marszałek K. *Bioaccessibility of antioxidants in blackcurrant juice after treatment using supercritical carbon dioxide. Molecules, 2022, 27(3), 1036*

- publikacja 4: Trych U., Bunikowska-Olejniak M., Marszałek K. *Bioaccessibility of betalains in beetroot (Beta vulgaris L.) juice under different high-pressure techniques. Molecules, 2022, 27(20), 7093*

Cykl publikacji jest wynikiem realizacji badań w ramach subwencji przyznanej przez MRiRW pt: „Badanie wpływu wysokiego ciśnienia na bioprzyswajalność hydrofilowych antyoksydantów przetworów owoców i warzyw” na lata 2019-2022.



Przestawiony cykl publikacji ukazał się w latach 2020-2022 gdzie sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wynosi 14,265 (wartość podana na moment ukazania się publikacji) z aktualną liczbą cytowań 21 (stan na 09.2023r.) co tylko podkreśla wagę i wartość poznawczą problemu dla środowiska naukowego jakiego podjęła się Doktorantka w tak krótkim czasie od publikacji. Wszystkie prace ukazały się w obiegu międzynarodowym. Fakt opublikowania w czasopiśmie naukowym obiegu międzynarodowego uzyskanych wyników oznacza, że zostały one poddane już ocenie merytorycznej i stanowią już swój istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej. Prezentowane publikacje cyklu są pracami współautorskimi, gdzie we wszystkich pracach współautorem jest promotor - dr hab. Krystian Marszałek oraz promotor pomocniczy dr inż. Magdalena Buniowska-Olejek z Uniwersytetu Rzeszowskiego, przy czym należy podkreślić, że Doktorantka we wszystkich publikacjach jest autorem wiodącym, a w pracach o charakterze badawczym także autorem korespondencyjnym. Do dysertacji dołączono także oświadczenia współautorów określające ich wkład i potwierdzające znaczący udział Doktorantki w powstaniu niniejszych prac cyklu.

Recenzowana dysertacja mgr inż. Urszuli Trych składa się z 193 stronicowego opracowania, z czego 64 strony stanowi część opisowa spójnego tematycznie cyklu publikacji. Struktura ocenianej pracy jest prawidłowa i zgodna z wymogami pisania eksperymentalnych rozpraw doktorskich. Praca składa się z następujących części, w skład których wchodzi: *streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, uzasadnienie wyboru tematu i materiału badawczego, cel i hipotezy oraz zakres pracy, materiał i metody badawcze z opisem części technologicznej, analitycznej i statystycznej, omówienie najważniejszych wyników wraz z ich dyskusją, podsumowaniem w formie zapisu obserwacji, spostrzeżeń i wnioskowania, spis literatury* (122 pozycje z najnowszego cyklu wydawniczego, w $\frac{3}{4}$ oparte na piśmiennictwie anglojęzycznym). Pracę uzupełniają właściwe *publikacje* wchodzące w cykl dysertacji.

W pracy pojawiły się nieliczne niedociągnięcia (błędy stylistyczne, interpunkcyjne oraz literówki), które w niczym jednak nie umniejszają wartości merytorycznej niniejszego opisu cyklu prac. Niestety z jedną kwestią jako Recenzent nie mogę się w pełni zgodzić z Doktorantką, iż „wiodącą grupą związków fenolowych w burakach ćwikłowych są betalainy” (str. 19), które nie stanowią żadnej wspólnej grupy z tymi związkami. Nie mogę również zgodzić się z Doktorantką, że burak ćwikłowy jest niezwykle „cennym składnikiem diety ze względu na zawartość witamin” i chodzi tutaj o wymienioną witaminę C (str. 19) gdyż zawiera jej poniżej 5 mg w 100g, przy czym jej zawartość w botwinie jest kilkunastokrotnie, istotnie wyższa (30 mg/100g), ale ona nie była poddawana analizie. Także zapis „monomerów delfinidyny (df-3-O-glu i df-3-O-rut)” (str. 52) jest niepoprawne, gdyż cząsteczki te są połączeniem aglikonu z cząsteczką cukru lub dwu-cukru, a słowo monomer



używamy do określania np. struktury flawan-3-oli (monomeryczna, dimeryczna, polimeryczna).

Ocena merytoryczna i wartość naukowa dysertacji

W części teoretycznej niniejszej dysertacji Doktorantka zawarła wprowadzenie do podjętej tematyki badań, przybliżyła uzasadnienie wyboru tematu niniejszej rozprawy przedstawiając rozważania na temat biodostępności i niekonwencjonalnych metod przetwarzania żywności uwzględniając w szczególności technologię wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym oraz umotywowwała wybór materiału roślinnego na potrzeby niniejszej dysertacji. W tej części pracy Doktorantka przeprowadziła krytyczną analizę obecnego stanu literatury w zakresie tematyki dysertacji wskazując na istniejące istotne braki w literaturze rozważanego tematu. Wszystkie te elementy wielowątkowo zostały zawarte i przedstawione w *publikacji 1: Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing*, co stanowi bardzo dobry wstęp do wprowadzenia zainteresowanego czytelnika w zakres pracy.

W dalszej części Doktorantka przedstawiła *cel pracy i hipotezy oraz zakres pracy*. Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr inż. Urszuli Trych było zbadanie możliwości zastosowania wysokich ciśnień hydrostatycznych i ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym dla poprawy biodostępności wybranych antyoksydantów obecnych w owocach i warzywach, z wykorzystaniem modelowego przewodu pokarmowego *in vitro* wg standardowej metodologii protokołu INFOGEST Minekus'a i wsp. (2014).

Cel pracy i hipotezy badawcze zostały określone poprawnie, a zaplanowany zakres badań pozwolił na ich pełną weryfikację, co niniejszym zostało dokonane i zaprezentowane w *publikacjach 2-4*.

Dodatkowo na schemacie Doktorantka przedstawiła zakres pracy oraz organizację badań dla lepszego zrozumienia układu doświadczeń (odpowiednik dla *publikacji 2-4*).

Następnie opisała szczegółowo materiał badawczy, technologiczne przygotowanie prób tj. soku z buraka ćwikłowego oraz puree i soku z czarnych porzeczek. Później Doktorantka opisała skrupulatnie część analityczną, co wydaje się, że mogło zostać już na tym etapie pominięte, gdyż dogłębnie zostało to przedstawione w *publikacjach 2-4* tym bardziej, że w publikacjach tych znalazły się np. dane pominięte w tym opisie a związane z typem i stężeniem enzymów, producentem odczynników itp. informacje, a jak wiemy detale te pozwalają na odtworzenie i weryfikację metodologii i uzyskanych wyników, a tym samym uwiarygadniają badania.



Doświadczalny plan pracy został zaplanowany poprawnie, a dobrane metody analityczne adekwatne do zaplanowanych prac analitycznych. Część analityczna oparta o techniki chromatografii cieczowej z detektorem PDA oraz chromatografii sprzężonej z detektorem MS/MS pozwoliły w pełni na uzyskanie wartościowych wyników w zakresie zawartości związków bioaktywnych (związków polifenolowych, betacyjan oraz witaminy C) w prowadzonych doświadczeniach związanych z biodostępnością i bioprzyswajalnością. Dodatkowo z metod analitycznych wykorzystano także standardowe testy do określenia aktywności przeciwutleniającej tj. metodę z użyciem kationorodnika ABTS oraz rodnika DPPH. Należy podkreślić, że stosowane metody obejmują celowane techniki badawcze dziś jak najbardziej powszechnie używane w technologii żywności w analizie chemicznej.

Ponadto, jako że praca oparta jest o cykl publikacji w części *omówienie i dyskusja wyników* przedstawiono zwięzłe *résumé* w formie komentarza do poszczególnych uzyskanych wyników zawartych w *publikacjach 2-4*, oraz *obserwacje i spostrzeżenia*, które stanowią przedwstęp dla przeprowadzonego wnioskowania.

Omówienie i dyskusja wyników odpowiadają na postawiony cel pracy oraz w pełni weryfikują postawione hipotezy badawcze w układzie oceniającym (8 podpunktów) jako:

- wpływ HPP / SCCD na stabilność i biodostępność witaminy C,
- wpływ HPP / SCCD na stabilność i biodostępność antocyjanów,
- wpływ HPP / SCCD na stabilność i biodostępność betalain,
- wpływ HPP / SCCD na pojemność przeciwutleniającą podczas trawienia,

co w pełni stanowiło odwzorowanie doświadczeń i uzyskanych wyników przedstawionych w 3 oryginalnych *publikacjach 2-4*. Na tym etapie opisu brakowało odniesienia przy przytaczanych wartościach liczbowych do konkretnych tabel i rysunków zamieszczonych w *publikacjach 2-4*, co ułatwiłoby uzyskanie pełnego obrazu osiągniętych wyników, a co było pewną niedogodnością na tym etapie oceny. Dodatkowo nasuwa się pytanie, dlaczego w przypadku produktów z czarnej porzeczki pominięto inne grupy z frakcji polifenolowej tj. zawartość i przemiany chociażby kwasów fenolowych czy flawonoli, a skupiono się tylko na najważniejszej frakcji antocyjanów? Należy pamiętać, że związki te poddane także procesowi określającemu biodostępność i bioprzyswajalność miały wpływ na finalne wartości wskazujące na potencjał przeciwutleniający, który także określono w pracy a nie jest on tylko uzależniony od frakcji antocyjanowej.

Wśród najważniejszych osiągnięć naukowych cyklu zaprezentowanych prac przez Doktorantkę należy wymienić, w przypadku:

- *publikacji 2 pt.: The bioaccessibility of antioxidants in black currant puree after high hydrostatic pressure treatment*, że technika HPP przy wybranych parametrach ciśnienia wpływa na



stabilność antocyjanów z puree czarnej porzeczki (200, 400 i 600 MPa) oraz witaminy C (400 i 600 MPa) w czasie trawienia oraz poprawę jej biodostępności (200 i 400 MPa/5min), przy czym efektu tego nie wykazano już wobec antocyjanów. Natomiast wzrost pojemności przeciwutleniającej przy jednoczesnej degradacji składników bioaktywnych podczas etapu trawienia wskazuje na powstawanie metabolitów o wysokiej aktywności np. kwasu protokatechowego z antocyjanów.

- publikacji 3 pt.: *Bioaccessibility of antioxidants in blackcurrant juice after treatment using supercritical carbon dioxide*, że technika SCCD nie wpłynęła na zwiększenie stabilności witaminy C oraz antocyjanów, nie wpłynęła także na poprawę biodostępności witaminy C oraz sumy antocyjanów ($p \geq 0.05$) w sokach z czarnej porzeczki chociaż poprawę biodostępności odnotowano dla delfinidyny (glukozydu i rutynozydu) przy parametrach ciśnienia 10 MPa.

W obu pracach wskazano, że różnice w biodostępności, stabilności i aktywności przeciwutleniającej analizowanych związków antocyjanowych mogą wynikać z ich budowy oraz rodzaju analizowanej matrycy (sok/puree) i jej składu na co wpływa także zmienne pH środowiska przewodu pokarmowego (jamy ustnej, żołądka, jelita cienkiego).

- publikacji 4 pt.: *Bioaccessibility of betalains in beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice under different high-pressure techniques*, że technika HPP przy ciśnieniu 200 MPa korzystnie wpływała na stabilność betalain w soku z buraka ćwikłowego na każdym etapie trawienia oraz na właściwości przeciwutleniające, przy ciśnieniu 400 i 500 MPa przyczyniała się do poprawy biodostępności betacyjanin jednak nie wpływała na biodostępność betaksantyn. Wyższa biodostępność betacyjanin wskazuje na znaczenie budowy chemicznej tych związków w ocenie biodostępności. Zastosowanie techniki SCCD, niezależnie od badanego poziomu ciśnienia, jak najbardziej jest pożądane w produkcji soków z buraka ćwikłowego o zwiększonych właściwościach, gdyż istotnie moduluje biodostępność betacyjanin i betaksantyn w porównaniu do soków kontrolnych, co daje szeroką perspektywę w projektowaniu żywności funkcjonalnej.

Na podstawie zrealizowanych badań oraz uzyskanych wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej Doktoranta sformułowała 19 punktów *obserwacji i spostrzeżeń* w zależności od wpływu procesów technologicznych na stabilność antyoksydantów (i), stabilność antyoksydantów podczas trawienia (ii), oraz wpływu procesów technologicznych na pojemność przeciwutleniającą (iii) oraz 6 wniosków, będących jednoznaczną odpowiedzią na postawiony cel i hipotezy pracy, z których, wyłania się jeden główny wniosek, że zastosowane innowacyjnych nietermicznych technik przetwarzania żywności w jej produkcji potwierdzają możliwość poprawy biodostępności wybranych składników bioaktywnych



a prace powinny nadal być kontynuowane z wykorzystaniem już mikrobioty jelitowej lub w warunkach *in vivo*.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska **mgr inż. Urszuli Trych pt.: „Wpływ wysokich ciśnień na biodostępność antyoksydantów owoców i warzyw”** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zapisane w ustawie z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. u. z 2014r. poz. 1852).

Przedstawiona do oceny rozprawa charakteryzuje się wartością poznawczą i praktyczną w zakresie określenia biodostępności i bioprzyswajalności antocyjanów, witaminy C i betalain jednocześnie stanowi wartościowe, oryginalne opracowanie naukowe, gdyż została zrealizowana przy pomocy dobrze dobranych technik badawczych co pozwoliło na uzyskanie wartościowych i wiarygodnych wyników i umożliwiło ich opublikowanie w czasopiśmie o znaczącej renomie w obszarze dyscypliny technologia żywności i żywienia. Otrzymane wyniki pracy mają dużą wartość poznawczą i wnoszą oryginalny wkład do rozwoju wiedzy z zakresu dyscypliny technologia żywności i żywienia, bardzo dobrze wpisują się w obecny nurt badań nad żywnością funkcjonalną pochodzenia roślinnego.

W związku z powyższym stawiam **wniosek do Wysokiej Rady Naukowej IBPRS-PIB o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Urszuli Trych do dalszych etapów przewodu doktorskiego prowadzonego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologii żywności i żywienia.**

Jednocześnie biorąc pod uwagę tematykę badań, jej wagę i osiągnięcia oraz cały dorobek Doktorantki wnioskuję do Rady Naukowej IBPRS-PIB o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pt.: „Wpływ wysokich ciśnień na biodostępność antyoksydantów owoców i warzyw” autorstwa mgr inż. Urszuli Trych.

Prof. dr hab. inż. Aneta Wojdyło