



**Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny
Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116
tel. +48 42 631-30-91, fax +48 42 631-31-28**

Prof. dr hab. inż. Joanna Kałużna-Czaplińska

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Guzowskiej

„Dobór technik ekstrakcyjnych do określenia wpływu czynników
środowiskowych
na metabolizm wątrobowców na przykładzie gatunku *Calypogeia azurea*”

wykonanej na Wydziale Chemii, w Zakładzie Chemii Analitycznej UAM
w Poznaniu

Promotorem rozprawy doktorskiej jest:

dr hab. Rafał Wawrzyniak, prof. UAM

Wstęp

Substancjami pochodzenia roślinnego, które cieszą się od wielu lat dużym zainteresowaniem są metabolity wtórne, stanowiące klasę niskocząsteczkowych związków chemicznych pochodzenia naturalnego. Metabolity wtórne w odróżnieniu od metabolitów pierwotnych (np. tłuszcze, cukry czy aminokwasy), nie są niezbędne do prawidłowego przebiegu procesów życiowych oraz wzrostu roślin, natomiast mogą posiadać unikalne właściwości przeciwgrzybiczne, przeciwbakteryjne, czy antyoksydacyjne. Poszukiwania tak ważnych z punktu widzenia medycznego, czy farmaceutycznego związków są dość trudne, ze względu na skomplikowany charakter i złożoność matrycy roślinnej. Analiza metabolitów wtórnych wymaga izolacji z matrycy, realizowanej najczęściej na drodze ekstrakcji, często w wysokiej temperaturze. Podwyższona temperatura może prowadzić do strat metabolitów,

bądź otrzymania ekstraktów o niższej zawartości związków biologicznie aktywnych. Obecnie coraz częściej stosuje się wspomagane techniki ekstrakcji, które z jednej strony skracają czas izolacji metabolitów oraz z drugiej strony wpływają na efektywność procesu. Tematyka zrealizowana w rozprawie doktorskiej przez mgr Małgorzatę Guzowską dobrze wpisuje się właśnie w ten obszar badań naukowych. Dotyczy bowiem izolacji lotnych związków organicznych (LZO) występujących w ciałach oleistych wątrobowców z zastosowaniem technik ekstrakcyjnych w różnych wariantach. Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki są aktualne, a zbadanie składu chemicznego wątrobowców pod kątem metabolitów wtórnych w porównaniu z innymi roślinami naczyniowymi jest niewystarczająco zbadane i opisane w literaturze. Dysertacja wpisuje się także w zasady tzw. „zielonej chemii analitycznej”, ponieważ Doktorantka w świadomy sposób ograniczyła, bądź dokonała eliminacji dużych ilości rozpuszczalników organicznych poprzez zastosowanie ekstrakcji wspomaganą mikrofalami (MAE) oraz użycie mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Uważam, że analityczny wkład pracy mgr Małgorzaty Guzowskiej jest duży i związany przede wszystkim z doбором właściwej techniki ekstrakcyjnej do izolacji lotnych związków organicznych i porównaniem profili LZO otrzymanych dla wątrobowców gatunku *Calypogeia azurea* z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Struktura i treść rozprawy doktorskiej

Recenzowana praca mgr Małgorzaty Guzowskiej napisana jest w formie tradycyjnej, w której wyróżnione zostały następujące części: wprowadzenie, cel pracy wraz z czteropunktowym zakresem badań, opis badań wraz z uzasadnieniem podjętych działań, opis metod badawczych, wyniki i dyskusja, podsumowanie oraz literatura. Cytowana literatura obejmuje blisko 300 pozycji naukowych, głównie zagranicznych. Ponadto, w przedstawionej do recenzji dysertacji znalazł się: wykaz dorobku naukowego, słownik terminów biologicznych, którego zamieszczenie zdecydowanie ułatwiło czytanie pracy oraz spis rysunków i tabel. Wykaz dorobku naukowego Doktorantki składa się z 2 publikacji naukowych, które ukazały się w czasopiśmie *Molecules* (*IF* = 5,581), 3 monografii pokonferencyjnych i jednego artykułu popularno-naukowego, który został opublikowany w czasopiśmie *Laboratorium*. Wyniki Doktorantki były także prezentowane podczas polskich i zagranicznych konferencji naukowych.

Wprowadzenie, opis wyników wraz z dyskusją dotyczący otrzymanych przez Doktorantkę rezultatów nie budzą większych moich wątpliwości. Podoba mi się, że Doktorantka przedstawiła i poddała ocenie wszystkie zastosowane techniki ekstrakcji, także te, gdzie wyniki nie były zadowalające, jak chociażby w przypadku ekstrakcji rozpuszczalnikowej ciało stałe-ciecz (SLE).

W części wprowadzającej do tematyki badań, znalazły się szczegółowe informacje na temat tego gatunku, omówione zostały roślinne metabolity wtórne i wpływ czynników środowiskowych na lotne związki organiczne oraz techniki ekstrakcyjne w różnych wariantach, które mogą znaleźć zastosowanie do izolacji związków zawartych w materiale botanicznym. Ta część rozprawy jest dobrym wprowadzeniem do części eksperymentalnej. Cel główny badań został sformułowany jasno i dotyczył wskazania najlepszej techniki ekstrakcyjnej do izolacji LZO zgromadzonych w ciałach oleistych wątrobowców z gatunku *Calypogeia azurea*. Oprócz celu głównego w rozprawie znalazły się także zadania badawcze, w skład których weszły: analizy LZO i wpływ czynników środowiskowych oraz warunków przechowywania próbek botanicznych na ich skład oraz badania wybranych metali ważnych z punktu widzenia fizjologicznego i toksycznego w materiale roślinnym.

W części doświadczalnej, dotyczącej opisu prowadzonych eksperymentów, szczególną uwagę zwrócono na techniki ekstrakcyjne, ich zastosowanie, charakterystykę i porównanie w odniesieniu do LZO obecnych w komórkach wątrobowców. Ważnym elementem jest zastosowanie analizy statystycznej do oceny różnic w izolacji lotnych związków organicznych z użyciem konwencjonalnej ekstrakcji ciecz-ciecz, po bardziej zaawansowane techniki ekstrakcyjne. Do identyfikacji składników zastosowano widma mas związków znajdujące się w takich bibliotekach widm, jak np. : NIST 2014, NIST WebBook, czy Adams Library 4.0 oraz wielkość retencyjną, która umożliwia identyfikację składników chromatografowanych, jaką jest indeks retencji Kovats'a. Wyniki analiz lotnych związków organicznych zestawiono w tabelach, gdzie w oparciu o metodę normalizacji wewnętrznej obliczono ich zawartości procentowe.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Za najbardziej wartościowe w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej uważam:

- dokonanie wyboru najlepszej, bezrozpuszczalnikowej techniki izolacji LZO

- z materiału roślinnego, jaką okazała się mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME),
- opracowanie procedury analitycznej oznaczania LZO w próbkach wątrobowców,
 - zbadanie wpływu czynników abiotycznych na zawartość lotnych związków organicznych w komórkach wątrobowców,
 - podjęcie się wyjaśnienia, jak warunki środowiskowe, sezonowość pobierania próbek i ich przechowywanie wpływają na zawartości LZO.

Uwagi

Recenzent poza oczywistym podkreśleniem walorów i zalet pracy ma także obowiązek wskazania pewnych niedociągnięć, uwag i postawienia pytań.

Wśród niedociągnięć w pracy, uwag dyskusyjnych, merytorycznych trzeba wymienić:

1. błędne sformułowania, np. na str.19 „... dzięki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas”, jeśli piszemy o technice to raczej powiemy chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas,
2. w moim odczuciu część botanicznego opisu na temat wątrobowców powinna być znacznie mniej rozbudowana, choć wdzięczna jestem za słownik terminów biologicznych, który znacznie ułatwił czytanie pracy,
3. jeśli faktycznie składniki zawarte w wątrobowcach np. LZO mogą pełnić funkcje prozdrowotne, to moje obawy budzi możliwość sprawdzenia, czy faktycznie mamy do czynienia z gatunkiem opisanym w dysertacji, czyli *Calypogeia azurea*, skoro jak napisano m.in. na str. 8 może wystąpić kłopot z rozdzieleniem materiału botanicznego, ze względu na fakt, że kilka gatunków rośnie razem,
4. trudno będzie pozyskać na większą skalę materiał do badań, ze względu na specyfikę gatunku, a skoro występują takie trudności to, jak Pani widzi dalszy potencjał swoich wyników badań?
5. Na jakiej podstawie przypuszcza Pani, że wątrobowce mogą być użyte jako potencjalne bioindykatory ? Jedno z kryteriów wykorzystania danego gatunku jako biowskaźnika mówi między innymi o jego biodostępności i wyborze gatunku, którego rozpoznanie nie budzi wątpliwości,
6. co rozumie Pani pod pojęciem wyspecjalizowane metabolity ? (str. 43),

7. Kilka razy zostało użyte w pracy słowo artefakt, np. str. 91, jak Pani rozumie jego znaczenie w kontekście tych badań?
8. W przypadku technik ekstrakcyjnych często sprawdza się nie tylko efektywność danej techniki pod kątem izolacji analitów z matrycy, ale także sprawdza się różne warianty mieszanin rozpuszczalników, chciałabym poznać Pani opinię w kontekście przeprowadzonych w rozprawie eksperymentów.

Podsumowanie recenzji

Stwierdzam, że mgr Małgorzata Guzowska wykazała się wiedzą w aktualnej tematyce będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej, a wskazane w recenzji uwagi nie umniejszają wartości dysertacji.

Praca spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do aktu prawnego - tekst jednolity: DzU z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.).

Wniosek końcowy

Podsumowując, recenzowana rozprawa mgr Małgorzaty Guzowskiej zatytułowana „Dobór technik ekstrakcyjnych do określenia wpływu czynników środowiskowych na metabolizm wątrobowców na przykładzie gatunku *Calypogeia azurea*” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, wnoszę o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Kałużna-Czaplińska

Łódź, 1 grudnia 2022 roku