



dr hab. Jolanta Kumirska
profesor Uniwersytetu Gdańskiego

Gdańsk, 21.01.2021 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Karoliny Korzeniowskiej z tytułem:

METODY WYDZIELANIA I OZNACZANIA SUBSTANCJI PRZECIWUTLENIAJĄCYCH W WYBRANYCH SUROWCACH ROŚLINNYCH

Podstawa opracowania recenzji: pismo dr. hab. Dariusza Walencika, prof. UO

Przewodniczącego Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego

z dnia 17 grudnia 2020 roku

Opracowanie skutecznych metod pozyskiwania aktywnych biologicznie związków z surowców pochodzenia roślinnego, jest aktualną tematyką badań realizowaną w wielu ośrodkach badawczych na całym świecie. W zależności od rodzaju i zawartości związków czynnych mogą one pełnić funkcję antyoksydantów, pochłaniać promieniowanie UV, działać antybakteryjnie, łagodzić podrażnienia, stymulować krążenie w naczyniach krwionośnych czy stanowić wspomagające naturalne filtry ochronne opóźniające między innymi procesy starzenia skóry. Najbardziej znane i cenione substancje, obecne w ekstraktach roślinnych, to związki fenolowe, w tym flawonoidy. Do związków aktywnych biologicznie zaliczamy także witaminy, fitosterole czy karotenoidy. W literaturze można znaleźć wiele doniesień dotyczących alg morskich jako cennych surowców związków o działaniu przeciwutleniającym, natomiast stosunkowo niewiele danych dotyczy alg słodkowodnych. Problem ten jest bardzo istotny, gdyż analiza ich składu pod kątem zawartości związków przeciwutleniających, w tym związków fenolowych, ocena ich zdolności przeciwutleniającej pozwoli oszacować, w jakim stopniu ekstrakty z alg słodkowodnych mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym, spożywczym czy rolniczym. Autorka recenzowanej pracy doktorskiej wpisuje się w wyżej przedstawiony nurt badań naukowych. Mgr Karolina Korzeniowska zajmuje się tematyką nie tylko istotną naukowo, ale pozwalającą na praktyczne wykorzystanie rezultatów badań do modyfikacji obecnie istniejących technologii wytwarzania naturalnych preparatów farmaceutycznych, kosmetycznych czy spożywczych. Tak więc praktyczny aspekt ocenianej pracy doktorskiej jest godny podkreślenia.

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Chemii Analitycznej Instytutu Chemii Uniwersytetu Opolskiego pod kierunkiem doskonałego naukowca, prof. dr. hab. inż. Piotra Pawła Wieczorka.



Rozprawa doktorska mgr Karoliny Korzeniowskiej liczy 183 strony, zilustrowana jest 49 rysunkami i 28 tabelami. Napisana jest w układzie z podziałem na następujące rozdziały:

- wykaz skrótów, akronimów i symboli (4 strony)
- wprowadzenie i część teoretyczna (66 stron);
- teza i cel pracy (2 strony);
- część doświadczalna oraz opracowanie i dyskusja wyników (66 stron);
- podsumowanie i wnioski (5 stron).

Dysertacja kończy się spisem rysunków i tabel, bibliografią (200 pozycji), streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem dorobku naukowego Kandydatki (7 publikacji naukowych, w tym 6 dotyczących tematyki recenzowanej pracy, sześć rozdziałów w monografiach naukowych (w tym 4 związane z tematyką rozprawy) oraz 25 doniesień konferencyjnych (18 dotyczących tematyki pracy doktorskiej), co wskazuje, że wybrane zagadnienia/tezy rozprawy zostały już opublikowane.

Cel pracy to: 1) opracowanie efektywnych metod wydzielenia substancji przeciwutleniających, w tym związków fenolowych, z glonów słodkowodnych z gatunku *Cladophora glomerata*, przy użyciu różnych technik ekstrakcji oraz typów ekstrahentów; 2) dokonanie analizy jakościowej i ilościowej próbek z wykorzystaniem metod chromatograficznych, kolorymetrycznych i spektrofotometrycznych w zakresie UV-Vis; 3) zbadanie właściwości przeciwutleniającej uzyskanych ekstraktów stosując metody kolorymetryczne (DPPH, ABTS, FRAP) oraz 4) potwierdzenie uniwersalności stosowanych procedur do oznaczania związków fenolowych i/lub innych związków o właściwościach przeciwutleniających w innych matrycach roślinnych (w suszonych owocach aronii, liściach pokrzywy, w skrzypie (zioło) oraz korze dębu).

Część doświadczalna pracy została poprzedzona przejrzystym przeglądem literatury, w którym Pani mgr Karolina Korzeniowska przedstawiła problematykę stresu oksydacyjnego, w tym jednostek chorobowych z nim związanych. Następnie omówiła najważniejsze zagadnienia związane z aktywnością i zdolnością przeciwutleniającą związków biologicznie aktywnych: podała definicję przeciwutleniaczy, ich rolę i podział; opisała mechanizm działania przeciwutleniaczy oraz metody badania właściwości przeciwutleniających. Kolejny rozdział poświęciła tematyce związków fenolowych, będących głównym obiektem zainteresowań badawczych Doktorantki, a następny – algom jako źródłem związków przeciwutleniających. Na końcu części teoretycznej opisała metody wydzielenia i oznaczania wybranych związków biologicznie aktywnych z materiału roślinnego. Nieliczne uwagi dotyczące tego rozdziału, jak i kolejnych w dysertacji, przedstawię nieco później.



Część doświadczalna (24 strony) zawiera opis zastosowanej aparatury, odczynników, materiału badawczego, szczegółowe informacje na temat stosowanych procedur badawczych: do wydzielenia związków przeciwutleniających z matrycy roślinnej, analizy jakościowej i ilościowej uzyskanych ekstraktów oraz zbadania ich właściwości przeciwutleniających.

Rozdział zatytułowany „*Opracowanie i dyskusja wyników*” został podzielony na siedem podrozdziałów.

W pierwszym Doktorantka skoncentrowała się na prezentacji wyników badań dotyczących porównania wydajność ekstrakcji związków fenolowych z biomasy alg z gatunku *C. glomerata* przy zastosowaniu trzech typów ekstrakcji: klasycznej ekstrakcji rozpuszczalnikiem (SE) poprzez wytrząsanie, ekstrakcji rozpuszczalnikiem wspomaganą mikrofalami (MAE) oraz ekstrakcji rozpuszczalnikiem wspomaganą ultradźwiękami (UAE). Ekstrakcję prowadziła przy użyciu 5 ekstrahentów: etanolu (EtOH), metanolu (MeOH), 70% EtOH, 70% MeOH oraz wody. Porównując wyniki wydajności ekstrakcji stwierdziła, iż najbardziej efektywnym ekstrahentem jest woda, najmniej efektywnym – EtOH. Biomasa alg z gatunku *C. glomerata* jest materiałem bogatym w związki hydrofilowe, ponieważ wydajność ekstrakcji rosła zgodnie ze wzrostem polarności rozpuszczalników. Porównując techniki ekstrakcji, najlepszą okazała się MAE, co było szczególnie widoczne dla metody z wykorzystaniem wody jako ekstrahenta. W przypadku użycia 70% roztworu EtOH, wartości wydajności uzyskane dla ekstrakcji rozpuszczalnikowej (SE) były wyższe, ale wynikało to prawdopodobnie z niejednorodności materiału biologicznego użytego do przeprowadzenia eksperymentów.

W drugiej części Pani mgr Karolina Korzeniowska zaprezentowała wyniki badań uzyskanych ekstraktów pod kątem zawartości związków fenolowych przeprowadzonych przy użyciu metody Folina-Ciocalteu'a (metoda F-C) oraz metody Christa-Müllera (metoda C-M). Są to powszechnie znane metody spektrofotometryczne, zaliczane także do metod kolorymetrycznych. Metoda Folina-Ciocalteu'a umożliwia oznaczenie całkowitej zawartości związków fenolowych (TPC); metoda Christa-Müllera – bazująca na reakcji z chlorkiem glinu - oznaczenie całkowitej zawartości flawonoidów (TFC). Wartości TPC wyznaczyła na podstawie pomiarów absorbancji badanych próbek po reakcji z odczynnikiem FCR oraz równania krzywej standardowej wykonanej dla kwasu galusowego (GAE) jako wzorca; wartości TFC na podstawie pomiarów absorbancji badanych próbek oraz równania krzywej standardowej wykonanej dla kwercetyny (QE) po reakcji z chlorkiem glinu jako wzorca.

Doktorantka stwierdziła, iż najwyższą zawartość związków fenolowych uzyskano dla ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą mikrofalami. Najlepszym ekstrahentem w wyodrębnianiu



związków fenolowych z matrycy glonowej była woda, najmniej efektywnym – EtOH. Stwierdziła, iż zawyżenie lub zaniżenie uzyskanych wartości TPC mogło być wynikiem obecności innych substancji w ekstrakcie, które reagując z odczynnikiem FCR dawały barwne produkty. Prezentując wyniki badań całkowitej zawartości flawonoidów w ekstraktach (parametr TFC) Doktorantka nie podała danych dla ekstraktów uzyskanych przy użyciu MeOH i EtOH jako ekstrahentów, ponieważ wartości TFC były wyższe od wyznaczonych wartości TPC. Odrzuciła je, ponieważ flawonoidy to jedna z podgrup związków fenolowych, stąd wartości TFC powinny być niższe niż TPC. Świadczy to o ograniczeniu metody C-M, która okazała się nieodpowiednia do badania ekstraktów alkoholowych bez dodatku wody.

Podobnie jak w przypadku metody F-C, najbardziej efektywnym typem ekstrakcji była metoda MAE z użyciem wody jako ekstrahenta. Najniższe stężenie flawonoidów odnotowała przy zastosowaniu UAE i 70% roztworu EtOH. Biorąc pod uwagę wpływ rozpuszczalnika, największą zawartość flawonoidów zaobserwowała dla wody (metoda MAE) oraz 70% roztworu MeOH (metoda UAE i SE).

Reasumując, uzyskane wyniki TPC i TFC są zgodne z polarnym charakterem związków fenolowych i polarnością rozpuszczalników zastosowanych do ich ekstrakcji (EtOH < MeOH < wodne roztwory alkoholi < woda).

Rozdział trzeci prezentuje wyniki analiz jakościowych i ilościowych ekstraktów algowych przy użyciu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem z matrycą diodową (PDA/DAD). Warunki analizy chromatograficznej zostały dobrane na podstawie danych literaturowych, po niewielkiej ich modyfikacji (w dysertacji nie podano na czym ta modyfikacja polegała). Identyfikacja analitów bazowała na porównaniu próbek ekstraktów z próbkami ekstraktów wzbogaconych związkami fenolowymi. Porównywano wartości czasów retencji, powierzchnię pików oraz widma absorpcyjne. Spośród 26 związków fenolowych, których standardy posiadano, w ekstraktach zidentyfikowano obecność 9 z nich: kwas galusowy, kwas chlorogenowy, kwas syringowy, kwas p-kumarowy, kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, kwas wanilinowy, kwas 4-hydroksybenzoesowy, mirycetyna, rutyna. Najmniej związków fenolowych Doktorantka zidentyfikowała w ekstraktach wodnych (do 5 związków), najwięcej w wodnych roztworach alkoholi (do 7 związków). Dodatkowo na podstawie uzyskanych wartości powierzchni pików oraz równań krzywych kalibracyjnych wyznaczyła stężenia analitów. Zawartości poszczególnych związków w ekstraktach były różne w zależności od zastosowanego ekstrahenta i metody ekstrakcji. Jedynie dla kwasu galusowego Doktorantka zaobserwowała zbliżone wartości, poza uzyskanymi dla próbki po ekstrakcji UAE i 70% MeOH.



W następnym rozdziale (rozdział czwarty) Doktorantka przedstawiła wyniki badań właściwości przeciwutleniających uzyskanych ekstraktów. Do oceny aktywności przeciwutleniającej ekstraktów zastosowała testy: 1) DPPH do oceny zdolności składników hydrofobowych poszczególnych ekstraktów do wychwytywania wolnych rodników; 2) ABTS do oceny zdolności składników hydrofilowych i hydrofobowych poszczególnych ekstraktu do inhibicji wolnych rodników; 3) FRAP do oznaczenia związków wykazujących właściwości redukujące. Wyznaczone wartości aktywności przeciwutleniającej oraz stężenia przeciwutleniaczy odnoszą się do całego składu ekstraktu, a nie wyłącznie związków fenolowych, ponieważ mogą one zawierać szereg innych związków o właściwościach przeciwutleniających. Stężenie przeciwutleniaczy w poszczególnych ekstraktach wyznaczyła na podstawie krzywej standardowej dla troloksu jako równoważną zdolność przeciwutleniająca troloksu (TEAC) w teście DPPH, ABTS oraz na podstawie krzywej kalibracyjnej wykonanej dla roztworu wzorcowego Fe(II) w teście FRAP.

Wyniki testu DPPH wykazały, że najwyższym potencjałem przeciwutleniającym charakteryzowały się ekstrakty uzyskane przy zastosowaniu wodnych roztworów alkoholi (aktywność około 50%), natomiast najniższym przy użyciu wody (aktywność około 20%). Rodzaj ekstrakcji nie rzutował znacząco na te wartości. Wyznaczone stężenia przeciwutleniaczy w poszczególnych ekstraktach, wykazały, iż największa ich ilość występuje w ekstraktach pozyskanych za pomocą ekstrakcji SE z wykorzystaniem wodnych roztworów alkoholi, natomiast najmniejsza dla EtOH jako ekstrahenta. Doktorantka przeprowadziła również wizualną ocenę badanych ekstraktów poprzez porównanie barwy próbek roztworów rzeczywistych z próbkami roztworów wzorcowych.

Wyniki testu ABTS także wykazały, iż najskuteczniejszym ekstrahentem była woda (aktywność około 50%) a najmniej efektywnym EtOH (aktywność około 10%). Wartości te były zbliżone dla ekstrakcji SE i UAE. Najwyższe stężenia przeciwutleniaczy wyznaczyła w ekstraktach pozyskanych metodą MAE z wykorzystaniem wody jako ekstrahenta, najniższe w ekstrakcie etanolowym przy użyciu SE.

Wyniki testu FRAP dla ekstraktów algowych udowodniły, iż największa zawartość związków o właściwościach redukujących znajduje się w próbkach po ekstrakcji wodą, najniższa w ekstraktach etanolowych. Najskuteczniejszym typem ekstrakcji była metoda MAE. Najwyższe stężenie związków redukujących oznaczono w ekstraktach wodnych przy użyciu MAE. Doktorantka dokonała też oceny kolorymetrycznej badanych próbek.

Z uwagi na fakt, że zawyżenie lub zaniżenie wyznaczonych wartości stężeń analitów w ekstraktach roślinnych - opisane i omówione we wcześniejszych rozdziałach - mogło być spowodowane złożonością matrycy, Pani mgr Karolina Korzeniowska postanowiła opracować wieloetapową ekstrakcję związków



fenolowych z materiału roślinnego, która zawierałaby etap oczyszczania, frakcjonowania i wzbogacania analitów. Tak skonstruowana procedura analityczna pozwoliłoby obniżyć poziom tła podczas analiz HPLC-DPA (usunąć interferencje), przy jednoczesnym zwiększeniu intensywności sygnałów oznaczanych związków powyżej granicy wykrywalności i oznaczalności stosowanej metody analitycznej. Opis procedury i wyniki tych badań Doktorantka przedstawiła w rozdziale piątym *Ekstrakcja wieloetapowa - wydzielenie, oczyszczanie, frakcjonowanie i wzbogacanie*.

Zaproponowana procedura składała się z trzech podstawowych etapów: I etap - odtłuszczenia surowca; II etap - wyodrębniania związków fenolowych; III etap - oczyszczania ekstraktów z cukrów oraz zateżnienia związków fenolowych. Doktorantka zastosowała dwa rozwiązania: a) w pierwszej procedurze, do I etapu wykorzystwała ekstrakcję heksanem w aparacie Soxhleta, a do ekstrakcji związków fenolowych (II etap) – UAE z użyciem łaźni ultradźwiękowej i MeOH jako ekstrahenta; b) w drugiej procedurze, I i II etap przeprowadziła przy użyciu UAE z wykorzystaniem sondy ultradźwiękowej (UAE (S)), przy czym w I etapie zastosowała heksan, natomiast w II etapie 70% roztwory MeOH o różnym pH. W obydwu procedurach III etap był taki sam i polegał na wykorzystaniu ekstrakcji do fazy stałej (SPE).

Z uwagi na to, iż efektywność odtłuszczenia biomasy alg przy użyciu sondy ultradźwiękowej (metoda UAE (S)) była wyższa niż przy użyciu aparatu Soxhleta, tylko te wyniki zostały zaprezentowane w dysertacji. Doktorantka podała nie tylko całkowitą zawartość kwasów tłuszczowych w ekstrakcie alg *C. glomerata*, ale także określiła zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych, nienasyconych kwasów tłuszczowych, związków z grupy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) oraz wybranych kwasów tłuszczowych.

Następnie, Doktorantka przedstawiła wyniki analizy wpływu pH ekstrahenta: 70% roztworu MeOH bez zakwaszenia (pH 6) oraz 70% roztworu MeOH zakwaszonego roztworem kwasu solnego do pH 2, na ekstrakcję związków fenolowych i aktywność przeciwutleniającą uzyskanego ekstraktu. Obydwie ekstrakcje przeprowadziła w takich samych warunkach sprawdzając: (a) wydajność ekstrakcji; (b) dokonując analizy zawartości związków fenolowych (TPC, TFC) oraz (c) badając aktywność przeciwutleniającą ekstraktów (test DPPH, ABTS, FRAP). Dodatkowo, sprawdziła wpływ pH na wydajność metody MAE. Uzyskane dane potwierdziły, że wydajność ekstrakcji dla 70% MeOH o pH 6 była niższa ($54,4 \pm 6,0$ mg/g), po zakwaszeniu tego samego ekstrahenta do pH 2 wzrosła do $80,8 \pm 1,8$ mg/g. Podobnie jak dla UAE (S), zakwaszenie środowiska ekstrahującego do pH 2 wpłynęło pozytywnie na wydajność ekstrakcji związków fenolowych przy użyciu metody MAE.



Jak wspomniano, opracowanie procedury ekstrakcji wieloetapowej miało na celu oczyszczenie ekstraktów oraz zatężenie związków fenolowych i/lub innych substancji w ekstraktach (etap III). W związku z tym Doktorantka dokonała analizy ekstraktów uzyskanych po II etapie procedury (bez zastosowania SPE) oraz po jej wprowadzeniu (III etap z SPE). Uzyskane wartości świadczyły o tym, iż ekstrakcja do fazy stałej oraz zastosowane złożo (Amberlit XAD-2) umożliwiły wzbogacenie ekstraktu w związki fenolowe i inne substancje o właściwościach przeciwutleniających i redukujących. Pani mgr Karolina Korzeniowska wykonała także analizę HPLC-PDA ekstraktów algowych (przed SPE oraz po SPE). Stwierdziła, że skład ekstraktów po jedno- i dwuetapowym procesie był podobny pod względem jakościowym, natomiast różny pod względem ilościowym. W ekstrakcie po oczyszczeniu na kolumnie SPE nie zidentyfikowała niektórych związków (kwasu galusowego, syringowego, p-kumarowego i 3,4-dihydroksybenzoesowego), natomiast oznaczyła związki, których nie wykryła poprzednio (rutynę, mirycetynę). Zaobserwowała też wyraźny wzrost stężenia kwasu wanilinowego po oczyszczeniu na kolumnie SPE.

Zdecydowała się także na frakcjonowanie ekstraktu (wydzieliła 13 frakcji) i poddała je analizie za pomocą metody F-C i ABTS oraz przy użyciu metody HPLC-PDA. W dwóch pierwszych frakcjach (F1-F2) zidentyfikowała dziewięć związków fenolowych, we frakcji trzeciej (F3) – siedem, we frakcji czwartej (F4) – dwa, a w pozostałych frakcjach (F5-F13) jeden związek. We wszystkich próbkach stwierdziła obecność kwasu wanilinowego, którego było najwięcej. Najwyższą aktywność przeciwutleniającą zaobserwowała również dla trzech pierwszych frakcji.

Część szósta opisuje rezultaty badań ekstraktów uzyskanych w wyniku jedno- i wieloetapowej procedury ekstrakcji za pomocą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC). Do wizualizacji rozdzieleń chromatograficznych zastosowała sześć podejść: 1) bez derywatyzacji, $\lambda = 254$ nm; 2) bez derywatyzacji, $\lambda = 366$ nm; 3) derywatyzacja 1% AlCl_3 , $\lambda = 254$ nm; 4) derywatyzacja 1% AlCl_3 , $\lambda = 366$ nm; 5) derywatyzacja NEU, $\lambda = 254$ nm; 6) derywatyzacja NEU, $\lambda = 366$ nm. Badania ekstraktów poprzedziła analiza HPTLC 26 roztworów wzorcowych związków fenolowych.

Analizy HPTLC umożliwiły identyfikację związków fenolowych oraz potwierdziły obecność niektórych substancji oznaczonych metodą HPLC. Doktorantka nie zidentyfikowała w ekstraktach kwasu kawowego, kwasu galusowego, kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego i kemferolu, prawdopodobnie z powodu ich znikomej ilości, której nie dało się oznaczyć zastosowaną metodą. Potwierdziła natomiast obecność kwasu wanilinowego, którego było najwięcej.



W ostatnim rozdziale części wynikowej dysertacji Doktorantka sprawdziła czy zastosowane metody wydzielenia i oznaczania przeciwutleniaczy w ekstraktach z alg słodkowodnych *C. glomerata* mogą być zastosowane do analizy innych materiałów roślinnych, np. wyłoków z całych owoców aronii (suszonych w całości); suszonych i zmielonych liści pokrzywa, suszonego i zmielonego skrzypu, suszonej i zmielonej kory dębu. Udowodniła, że są to metody uniwersalne, które mogą być z powodzeniem zastosowane do wydzielenia i oznaczania związków fenolowych i/lub innych substancji przeciwutleniających w ekstraktach roślinnych różnego pochodzenia (owoce, zioła, kora drzewna, glony).

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Korzeniowskiej zaliczam:

1. Opracowanie efektywnej metody ekstrakcji związków fenolowych i/lub innych substancji przeciwutleniających z alg słodkowodnych z gatunku *Cladophora glomerata*.
2. Sprawdzenie efektywności różnych typów ekstrakcji (SE, UAE, MAE) i różnych rozpuszczalników (etanolu, metanolu, 70% EtOH, 70% MeOH oraz wody) do uzyskania największej ilości ekstraktu oraz wyodrębnienia największej ilości substancji przeciwutleniających (w szczególności związków fenolowych) z biomasy alg słodkowodnych.
3. Udowodnienie, że biomasa alg słodkowodnych z gatunku *Cladophora glomerata* jest źródłem związków przeciwutleniających, takich jak związki fenolowe i kwasy tłuszczowe, co czyni ją wartościowym surowcem dla przemysłu kosmetycznego, farmaceutycznego, spożywczego czy rolniczego.
4. Sprawdzenie użyteczności testów DPPH, ABTS i FRAP do oceny aktywności przeciwutleniającej ekstraktów roślinnych.
5. Opracowanie wieloetapowej metody ekstrakcji związków fenolowych i/lub innych substancji przeciwutleniających z glonów słodkowodnych, z gatunku *Cladophora glomerata*, umożliwiającej wyodrębnienie, oczyszczenie, wzbogacenie i frakcjonowanie analitów.
6. Wykazanie, że zakwaszenie medium ekstrahującego do pH 2 sprzyja ekstrakcji związków fenolowych i innych substancji o właściwościach przeciwutleniających.
7. Wykazanie, że metody chromatograficzne (HPLC-PDA, HPTLC) mogą być z powodzeniem zastosowane do analizy jakościowej i ilościowej ekstraktów algowych.
8. Wykazanie uniwersalności stosowanych metod do oznaczania związków fenolowych w różnego rodzaju matrycach roślinnych.



Uwagi/pytania/wątpliwości, które nasunęły mi się podczas studiowania niniejszej rozprawy doktorskiej są następujące:

- Skróty/akronimy/symbole zaprezentowane w wykazie nie są podane w porządku alfabetycznym, co utrudnia znalezienie poszukiwanego akronimu. Dlaczego Autorka zdecydowała się na taką formułę?
- Str. 15. Technika $^1\text{H-NMR}$ definiowana jest jako protonowy jądrowy rezonans magnetyczny, natomiast technika $^{13}\text{C-NMR}$ jako jądrowy rezonans magnetyczny węgla. Dlaczego?
- Tekst jest napisany ładnym, merytorycznie poprawnym językiem, choć czasami zdarzają się niepoprawne sformułowania, błędy stylistyczne czy błędy edytorskie. Jako przykład podam niepotrzebne stosowanie przecinków podczas prezentowania porównań, np. w zdaniu na stronie 19 „...*...pomiędzy nadmierną aktywnością wolnych rodników, a mechanizmami obronnymi...*”; dokonujemy rozdzielenia składników mieszaniny a nie ich rozdziału (np. na stronie 63 widnieje zapis „*Zabieg ten pozwala na **rozdział** próbki/ekstraktu na frakcje zgodnie z rozpuszczalnością...*”; w tekście brakuje odniesienia do Tabeli 2 i 3; strona 78 zapis „*droga przebyta przez środek plamki*” jest niejasny; strona 116 „*wykorzystując różne długości fali ($\lambda=214, 254, 270, 280$).*” brakuje jednostki).
- Rysunek 17 (strona 54). Metody spektrofotometryczne, kolorymetryczne, chromatograficzne, elektromigracyjne i spektroskopowe zaliczane są do metod instrumentalnych, a nie metod chemicznych.
- Strona 66. Autorka podaje że „*Węglowodany strącano za pomocą metanolu lub etanolu.*” Czy na pewno strącano?
- Strona 73-74. Doktorantka słusznie podaje, że aby dokonać analizy związków fenolowych za pomocą techniki GC należy przeprowadzić proces ich derywatyzacji do lotnych pochodnych. Zgodnie z podaną informacją „*Do odczynników pozwalających utworzyć lotne pochodne związków fenolowych należą między innymi trimetylosilil, diazometan, chloromrówczan metylu/etylu, DMSO, jodan metylu, trifluoroacetamid.*” Proszę podać mechanizmy derywatyzacji związków fenolowych przy użyciu tych odczynników. Czy nazwy wszystkich odczynników derywatyzujących są poprawne?
- Strona 74. Podczas opisywania techniki HPLC Doktorantka podaje że „*Przeprowadza się ją zwykle do temperatury 200°C i ciśnieniu do 2000 atm.*” Czy w technice HPLC można stosować tak wysokie temperatury?
-



- Strona 85. Rozdział 1.1. Aparatura. Przy opisie wagi technicznej, wagi analitycznej i mieszadła magnetycznego z dipolem brakuje producenta.
- Rysunek 21, strona 91. Podczas prezentacji warunków metody MAE jako ekstrahent podany jest także octan etylu, aceton, niewspomniany w dalszej części dysertacji. Proszę o wyjaśnienie.
- Strona 94 i dalsze. Termin „*ekstrakt w kwaśnej wodzie*” nie jest zbyt fortunny.
- Strona 96. Brakuje informacji w jaki sposób przeprowadzono frakcjonowanie próbki. Wiadomo, iż zebrano 13 frakcji, ale na jakiej zasadzie?
- Strona 131-132. Rozdział 5.1. prezentuje wyniki oznaczania zawartości kwasów tłuszczowych w ekstrakcie heksanowym uzyskanym w wyniku odtłuszczenia biomasy alg. Autorka podaje iż „*W celu sprawdzenia efektywności etapu odtuszczenia, otrzymaną frakcję heksanową zatężono i poddano analizie pod kątem oznaczenia zawartości kwasów tłuszczowych w ekstrakcie.*”. Niestety ani w części eksperymentalnej ani w części wynikowej nie są podane warunki tych oznaczeń. Proszę o uzupełnienie brakujących danych.
- Strona 134. Widnieje tu następująca informacja ”*Zmiana środowiska ekstrahenta na bardziej kwaśne (pH=2) wpłynęła korzystnie na ekstrakcję związków fenolowych i aktywność przeciwutleniającą. Wynika to z faktu występowania grup hydroksylowych w formie sprotonowanej.*” W mojej ocenie zdecydowanie bardziej pasuje wyjaśnienie „*Wynika to z faktu występowania grup hydroksylowych w formie niezdysonowanej*”.
- Rozdział 6. Analiza HPTLC ekstraktów algowych. Na stronach 103-104 części eksperymentalnej Doktorantka podała, iż do wizualizacji rozdzieleń HPTLC zastosowała następujące metody: a) metoda fizyczna – wizualizacja promieniowaniem UV ($\lambda=254$ i 366 nm); b) metoda chemiczna z przeprowadzeniem derywatyzacji z wykorzystaniem 1% metanolowego roztworu $AlCl_3$ oraz c) metoda chemiczna z przeprowadzeniem derywatyzacji z użyciem odczynnika NEU (1% metanolowy roztwór estru eminoetylowego kwasu difenyloforowego). Warto byłoby uzupełnić dyskusję wyników o mechanizm tych derywatyzacji.
- Strona 173. W streszczeniu widnieje następujące stwierdzenie „*Odpowiednia **utylicacja** biomasy alg może przyczynić się do wykorzystania ekstraktów jako cennych komponentów różnych produktów, a tym samym poprawić jakość wód*”. Czy na pewno termin „*utylicacja*” w tym zdaniu jest właściwy? Oceniając pracę doktorską należy podkreślić, iż badania zostały poprawnie zaplanowane i przygotowane, zaś warsztat analityczny nie budzi zastrzeżeń.



Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Korzeniowskiej w pełni odpowiada wymogom i warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. *o stopniach naukowym i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789 z późn. zm.). Przedstawione uwagi nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej. Praca charakteryzuje się potencjalną wartością aplikacyjną przedstawionych w rozprawie doktorskiej rozwiązań, zawiera elementy nowości naukowej, a wymienione uwagi/pytania nie umniejszają mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy. Przedstawione wyniki badań świadczą również o umiejętności rozwiązywania problemów metodologicznych i doświadczalnych przez Doktorantkę. Napisana przez Panią mgr Karolinę Korzeniowską rozprawa świadczy, że posiada wiedzę i umiejętności wymagane dla doktora nauk chemicznych. Wobec powyższego wnioskuję o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Mając na uwadze wysoki poziom badań wchodzących w skład recenzowanej pracy doktorskiej oraz fakt, że znaczna część wyników została opublikowana w renomowanym czasopiśmie z listy JCR - co stanowi niewątpliwe niezależne potwierdzenie ważności wybranej tematyki badawczej - wnoszę o jej wyróżnienie w sposób przewidziany regulaminem Uczelni.

Jolanta Kumirska