

Wrocław, 24.10.2019 r.

Prof. dr hab. Jan Oszmiański
Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Nutraceutyków Roślinnych
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

R E C E N Z J A rozprawy doktorskiej

Recenzja przedłożonej rozprawy doktorskiej mgr Dariusza Jędrejka pt. ”

Związki fenolowe chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.) – skład oraz zawartość w polskich i zagranicznych odmianach uprawnych”, wykonanej w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów, Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach składa się z oceny następujących elementów:

1. Dobór i znaczenie tematu.
2. Bibliografia i znajomość literatury.
3. Układ pracy i wymogi formalne.
4. Zastosowana metodyka badań.
5. Koncepcja rozwiązania problemu naukowego i przedstawionych wyników.
6. Prawidłowość wnioskowania.
7. Ocena końcowa.

Ad. 1. Ocena doboru i znaczenia tematu

Mgr Dariusz Jędrejek w monografii stanowiącej rozprawę doktorską podjął się kompleksowych badań nad związkami fenolowymi chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.). identyfikował i oznaczał je w polskich i zagranicznych odmianach uprawnych. Szczególnie zajmował się drugorzędowymi metabolitami wtórnymi w takich częściach anatomicznych tej rośliny jak: korzenie i liście, jak również w męskiej formie kwiatostanu chmielu. Dotychczas w badaniach poddawano głównie szyszki odmian uprawnych chmielu, w tym analizowano zwłaszcza pierwszorzędowe metabolity wtórne jak: kwasy goryczkowe i terpeny. W mniejszym stopniu znane są inne drugorzędowe metabolity wtórne tej rośliny. Badania doktoranta miały na celu uzupełnienie wiedzy na temat składu fitochemicznego *H. lupulus*. Autor uzyskał wiarygodne wyniki dzięki zastosowaniu najnowszych metod analitycznych do identyfikacji i oznaczeń ilościowych związków fenolowych, wykorzystując nowoczesny sprzęt jak: ultrasprawy chromatograf cieczerw ACQUITY UPLC sprzężony z detektorem fotodiodowym (PDA) oraz spektrometrem mas (MS) ACQUITY TQD UPLC/MS oraz spektrometr magnetycznego rezonansu jądrowego Bruker Avance III 500 MHz.

Zagadnienia, które przedstawił w rozprawie mgr Dariusz Jędrejek są aktualne, ważne dla nauki, wymagały dużej wiedzy i doświadczenia w opanowaniu licznych technik analitycznych z wykorzystaniem nowoczesnych metod w tym szczególnie trudnych w identyfikacji związków spektrometrii mas i rezonansu magnetycznego. Podjęcie kompleksowych badań nad identyfikacją i oznaczeniem związków fenolowych w chmielu uważam za trafne, ważne i aktualne, uzasadnione ze względów poznawczych i praktycznych. Autor wybrał do badań ważny surowiec, który zawiera wyjątkowo dużo związków fenolowych o złożonej budowie, trudnych do identyfikacji i oznaczania. Dzięki wykorzystaniu złożonych i pracochłonnych metod ekstrakcji oraz analizie uzyskanych ekstraktów za pomocą ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem fotodiodowym i spektrometrem mas (UPLC-PDA-ESI-MS) i jedno- i dwuwymiarowego jądrowego rezonansu magnetycznego (1D i 2D NMR) ocenił dotychczas niedostatecznie poznany profil wtórnych metabolitów związków fenolowych w chmielu. Wykazał po raz pierwszy w rodzaju *Humulus* obecność dotychczas niezidentyfikowanych 16 związków.

Praca ma dużą wartość poznawczą i praktyczną. Doktorant podjął się bardzo trudnego, ważnego dla nauki, interesującego tematu badań.

Ad. 2. Ocena bibliografii i znajomości literatury

Bibliografia pracy jest bardzo bogata liczy 182 pozycje, w tym tylko 5 jest w języku polskim. Dobór literatury zawierającej najnowsze doniesienia naukowe jest trafny i ściśle związany z tematem badań. Autor wykazał się dużą dociekliwością i pracowitością w gromadzeniu informacji ze światowej literatury. Recenzent nie ma zastrzeżeń odnośnie znajomości tematu, zakresu i sposobu wykorzystania przedstawionej literatury.

Ad. 3. Ocena układu pracy i wymogów formalnych

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Dariusza Jędrejka przedstawiona na 172 stronach maszynopisu, dotyczy charakterystyki profilu i zawartości związków fenolowych w polskich i zagranicznych odmianach uprawnych chmielu. W pełni spełnia ona wymagania stawiane pracom doktorskim. W pierwszej części maszynopisu rozprawy na 37 stronach Autor przedstawił informacje na podstawie bogatej literatury ściśle związane z tematem pracy, następnie cel, część doświadczalną zawierającą opis materiału i metod badawczych, wyniki i dyskusję, wnioski, streszczenia, spis piśmiennictwa, rysunków i tabel.

We wstępnej części pracy, zamieszczone są podstawowe informacje o charakterystyce botanicznej i taksonomii chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.), historii i obecnego zastosowania tej rośliny, uprawie, typach użytkowych oraz odmianach uprawnych chmielu. W dalszej części scharakteryzowany jest szczegółowo skład chemiczny oraz metabolity wtórne szyszek chmielu zwyczajnego. Kolejna część poświęcona jest aktywności biologicznej związków fenolowych chmielu. Zagadnienia te są ściśle związane z przedmiotem Jego badań. Materiał opracowany został z wykorzystaniem bogatego piśmiennictwa, Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością zagadnień dotyczących metabolitów wtórnych chmielu zwyczajnego. W zakończeniu wstępu uzasadnił celowość badań własnych z tego zakresu.

Do tej części pracy mam drobne uwagi, Autor używa pojęcia „fenole chmielu”, moim zdaniem poprawniejsze jest określenie „związki fenolowe chmielu”, „fenol” kojarzy się z trującym związkiem, który w takiej postaci prostej to jest tylko pierścienia benzenowego z grupą – OH nie występuje w świecie roślin. Ponadto poprawnie jest używanie nazw związków fenolowych nie „katechina, epikatechina” ale „(+) katechina, (-)epikatechina” gdyż w takiej postaci występują one w naturze. Autor błędnie stawia kropki po tytułach tabel i rysunków. Te uwagi dotyczą całości pracy.

Cel pracy został przedstawiony poprawnie, obejmował precyzyjnie określone siedem celów szczegółowych dotyczących analizy jakościowej i ilościowej drugorzędowych związków polifenolowych w organach wegetatywnych i generatywnych chmielu uprawnego i europejskiego (*H. lupulus* var. *lupulus*).

W części doświadczalnej pracy na 12 stronach poprawnie i obszernie zaprezentowany jest opis materiału badawczego, wykonania doświadczeń nad ekstrakcją poszczególnych frakcji związków fenolowych oraz zastosowanych metod analitycznych. Brak jest informacji wg kogo były wykonane sposoby przygotowania poszczególnych frakcji oraz analiz chromatograficznych i spektroskopii NMR. Czy to są własne metody Autora? Wyjątkiem jest analiza cukrów, w której Doktorant podaje, że przeprowadzono te oznaczenia zgodnie z metodą opracowaną przez Tanaka i in. [2007] z modyfikacjami.

Rozdział „Wyniki badań i dyskusja” jest przedstawiony na 89 stronach, podzielony w logiczny sposób na podrozdziały zgodnie z kolejnością przeprowadzonych doświadczeń. Wyniki badań są bogato ilustrowane 14 wykresami, zamieszczone 32 tabelach oraz uzupełnione obliczeniami statystycznymi.

Autor na stronie 90 podaje: „Dwa wyizolowane monomery flawan-3-oli (związki 28 i 29) charakteryzowały się identycznym widmem w nadfiolecie ($\lambda_{\max}$ = 278 nm), widmem masowym (ESI-, m/z 289; ESI+, m/z 291) oraz widmem fragmentacyjnym (ESI+, m/z 139,

165 oraz 207), natomiast zdecydowanie różniły się czasem retencji w warunkach zastosowanego rozdziału chromatograficznego (Tabela 12). Pełna identyfikacja strukturalna została przeprowadzona z zastosowaniem 1D oraz 2D NMR. Wyniki eksperymentów NMR przedstawiono w Tabeli 18, i były one zgodne z danymi literaturowymi [Davis i in., 1996]. W ten sposób związek 28 zidentyfikowano jako katechinę, a 29 jako epikatechinę.”

Poprawniej powinno być nie „katechinę, a 29 jako epikatechinę” tylko „(+) katechinę, a 29 jako (-) epikatechinę”. Na usprawiedliwienie Doktoranta także autorzy cytowanej publikacji [Davis i in., 1996] także używają nazw „katechina i epikatechina”. Moim zdaniem w tym przypadku nawet bez zastosowania 1D oraz 2D NMR można było potwierdzić obecność tych związków na podstawie czasów retencji dostępnych standardów (+) katechiny i (-)epikatechiny.

Autor podaje na stronie 96: „Ponadto, w ekstrakcie E3 zidentyfikowano trzy izomery kwasu kawoilo-chinowego (związek 35 – kwas 3-chlorogenowy, 36 – kwas 5-chlorogenowy, 37 – kwas 4-chlorogenowy)” raczej powinno być „Ponadto, w ekstrakcie E3 zidentyfikowano trzy izomery kwasu kawoilo-*O*-chinowego (związek 35 – kwas 3-chlorogenowy, 36 – kwas 5-neochlorogenowy, 37 – kwas 4-kryptochlorogenowy)”. Wszystkie standardy tych kwasów są dostępne do identyfikacji i oznaczania ilościowego.

W końcowej części rozprawy doktorskiej mgr Dariusz Jędrejek przedstawił dobrze opracowane 10 wniosków oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Ostatnia część pracy to poprawnie przygotowany spis literatury, tabel i rysunków. Godnym podkreślenia, pomocnym w czytaniu maszynopisu jest zamieszczenie na początku objaśnień skrótów stosowanych w pracy.

Ad.4.Ocena zastosowanej metodyki badań

Doktorant w swych badaniach stosował aktualnie najbardziej nowoczesne, na światowym poziomie, metody analityczne dla ustalenia budowy chemicznej wyizolowanych związków korzystając z analiz spektralnych, tj. widma UV, spektroskopii mas oraz jedno- i dwuwymiarowego jądrowego rezonansu magnetycznego (1D i 2D NMR) oraz metod chemicznych jak hydroliza kwasowa. Pozwoliły one w sposób wiarygodny i w pełni zidentyfikować badane związki. Podobnie do przygotowania próbek wykorzystywał najnowsze osiągnięcia z tego zakresu jak: ekstrakcję do fazy stałej (SPE) na mikrokolumnie C18 (Oasis HLB 12cc (500 mg), chromatografię kolumnową z użyciem żywicy jonowymiennej Amberlite IRA-400, chromatografię kolumnową preparatywną

niskociśnieniową z różnym wypełnieniem jak złożeń chromatograficznych: LiChroprep silica 60 (25-40 μm , Merck), RP-18 (LiChroprep RP-18, 25-40 μm i Sephadex LH-20, chromatografię preparatywną wysokociśnieniową HPLC na kolumnie C18 (10 x 250 mm, 5 μm , Kromasil) oraz chromatografię cienkowarstwową (TLC) na płytkach silica gel 60 F254. Do ekstrakcji stosował ekstraktor ciśnieniowy ASE 200 i sonifikator ultradźwiękowy. Dzięki właściwie dobranym procedurom ekstrakcji i frakcjonowania mógł z dużym sukcesem otrzymać preparaty i zidentyfikować poszczególne związki.

Zastosowane metody analityczne były wyjątkowo złożone i czasochłonne, wymagały dużego nakładu pracy, w pełni pozwoliły zrealizować założony ambitny cel badań. Wniosły wiele nowych informacji z zakresu poznania związków fenolowych chmielu.

Szczególnie bardzo wysoko oceniam dużą wiedzę mgr Dariusza Jędrejka w zakresie odpowiedniej interpretacji widm MS z fragmentacjami z detektora masowego oraz jedno- i dwuwymiarowego jądrowego rezonansu magnetycznego (1D i 2D NMR).

Część analityczna, która obejmowała dużą ilość bardzo trudnych, czasochłonnych i pracochłonnych badań zasługuje na szczególne podkreślenie i stanowi najwartościowsze osiągnięcie Autora pracy. Duża ilość badań pozwoliła na uzyskanie wielu nowych informacji z tego zakresu.

Ad.5.Ocena koncepcji rozwiązania problemu naukowego i przedstawionych wyników

Badania mgr Dariusza Jędrejka dotyczyły trudnego i ambitnego zadania identyfikacji i oznaczania drugorzędowych związków polifenolowych obecnych w organach generatywnych (kwiatostanach i owocostanach) oraz wegetatywnych (korzeniach i kłęczach, łodygach oraz liściach) odmiany uprawnej chmielu 'Marynka', a także formy męskiej i żeńskiej chmielu europejskiego (*H. lupulus* var. *lupulus*). Przeprowadził również oznaczenia ilościowe zawartości drugorzędowych związków polifenolowych w szyszkach chmielu europejskiego oraz różnych odmian chmielu uprawnego. Wszystkie badania były przeprowadzone, z dużym sukcesem, profesjonalnie, kompleksowo i w szerokim zakresie z użyciem nowoczesnych technik analitycznych. Na podkreślenie zasługuje dobre opanowanie metod identyfikacji i wiedza w zakresie trudnych interpretacji widm UV-Vis, widm MS/MS (jonów pseudomolekularnych: $[M]^+$ i jonów fragmentacyjnych: $[M-X]^+$), oraz danych jedno- i dwuwymiarowego jądrowego rezonansu magnetycznego (1D i 2D NMR) które pozwoliły na osiągnięcie sukcesu w identyfikacji związków o złożonej budowie chemicznej.

Z szyszek organu generatywnego żeńskiego oraz kwiatostanu męskiego chmielu zwyczajnego Doktorant wyizolował metodami chromatograficznymi 42 związki fenolowe, których struktury chemiczne zostały w pełni określone przy użyciu metod analizy spektralnej: NMR i spektrometrii mas (LC-PDA-ESI-MS/MS), oraz hydrolizy kwasowej. Dużym sukcesem było wykrycie po raz pierwszy w rodzaju *Humulus* obecności 16 związków fenolowych z różnych grup, w tym 6 glikozydów flawonoli, 4 chalkonów, 4 flawanokumaryn oraz 2 amidów fenolokwasowych. Ponadto, w organach generatywnych i wegetatywnych chmielu zwyczajnego zidentyfikował na podstawie analiz LC-PDA-MS/MS oraz danych literaturowych, 48 innych związków polifenolowych, których zawartość w chmielu zwyczajnym była dotychczas nieoznaczona.

Istotnym osiągnięciem mgr Dariusza Jędrejka były oznaczenia ilościowe metodą rozdziału UPLC-PDA-MS 39 związków fenolowych, należących do sześciu grup drugorzędowych polifenoli w wyciągach z szyszek sześciu odmian uprawnych chmielu oraz chmielu europejskiego. W badaniach tych wykazał istotne różnice w stężeniu poszczególnych związków fenolowych w dwóch sezonach wegetacyjnych 2012 oraz 2014. Wyniki tych badań poddał analizie porównawczej z zastosowaniem metod chemometrycznych (CA oraz PCA), która pozwoliły na pogrupowanie odmian chmielu w klastry oraz ich powiązanie (korelacja dodatnia i/lub ujemna) z drugorzędnymi polifenolami.

Nowością w badaniach Doktoranta było porównanie zawartości związków fenolowych w wyciągach z organów generatywnych (kwiatostany i szyszki) oraz wegetatywnych (korzenie i kłącze, łodygi oraz liście) w próbkach chmielu. Oznaczył ilościowo 57 związków fenolowych, należących do siedmiu grup drugorzędowych polifenoli chmielu wykazując duże różnice (jakościowe oraz ilościowe) w profilach fitochemicznych części podziemnych (korzenie i kłącze) i części nadziemnych, oraz organów generatywnych (kwiatostany i owocostany) i nadziemnych organów wegetatywnych (liście i łodygi), a także żeńskiej i męskiej formy chmielu zwyczajnego. W męskich kwiatostanach stwierdzono występowanie polifenoli nieobecnych w organach generatywnych żeńskiej formy chmielu (związki z grupy amidów fenolokwasowych, flawonoli, chalkonów), z kolei nie wykazano obecności multifidoli.

Założenia i koncepcja rozwiązania problemu naukowego w pracy doktorskiej mgr Dariusza Jędrejka były poprawne. Zostały dobrze, profesjonalnie wykonane doświadczenia, zwłaszcza identyfikacji związków nowoczesnymi metodami, które pozwoliły na uzyskanie dużego sukcesu naukowego w zakresie wiedzy na temat związków fenolowych chmielu. Autor dysponował nowoczesnymi technikami i aparaturą naukową, którą w pełni

wykorzystał do przeprowadzenia badań własnych. Pozwoliło to na wykazanie po raz pierwszy, występowanie w tej roślinie 16 dotychczas nieoznaczonych związków fenolowych. Autor zidentyfikował i oznaczył ilościowo związki fenolowe także w różnych częściach anatomicznych, a także w kwiatostanach męskiej formy chmielu zwyczajnego, dotychczas takich kompleksowych badań tej rośliny nie prowadzono. Wyniki te mają dużą wartość poznawczą i praktyczną w ocenie potencjalnych możliwości wykorzystania w całości tej rośliny, a nie tylko jak dotychczas szyszek.

Ad.6. Ocena prawidłowości wnioskowania

Doktorant przedstawił 10 dobrze sformułowanych poprawnych wniosków w których przedstawione są najważniejsze wyniki dobrze udokumentowanych własnych badań.

Ad..7. Ocena końcowa

Oceniając merytorycznie przedłożoną do recenzji pracę doktorską mgr Dariusza Jędrejka stwierdzam, że Autor wykazał się gruntowną znajomością tematyki badań, poprawnie zaplanował i wykonał wyjątkowo trudne eksperymenty wykazując się umiejętnością posługiwania najnowocześniejszą dostępną aparaturą analityczną uzyskując dużą ilość wartościowych wyników. Szczególnie należy podkreślić bardzo duży zakres różnorodnych, czasochłonnych analiz oraz izolację i identyfikację związków fenolowych rodzaju *Humulus*, ze szczególnym uwzględnieniem gatunku *H. lupulus*.

Wyniki tych prac stanowią ważny wkład w poznanie składu związków fenolowych w chmielu. Bardzo duża ilość doświadczeń wniosła wiele nowych informacji z ważnego dla nauki i praktyki zakresu badań.

Uważam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa mgr. Dariusza Jędrejka w pełni odpowiada wymogom art. 20, punkt 1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 03,65,595) stawianym pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr Dariusza Jędrejka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie proponuję wyróżnić rozprawę mgr Dariusza Jędrejka za szczególnie duży wkład pracy w wykonanie analiz przeprowadzonych metodami na światowym poziomie, pełną identyfikacją związków fenolowych w rodzaju *Humulus*, w tym po raz pierwszy stwierdzoną obecność 16 związków dotychczas nie oznaczonych w tej roślinie, oraz bardzo wysoki poziom naukowy i szeroki zakres badań, co znacznie przekracza pracę doktorską.

Oszmiński