

Warszawa, 05.09.2025

Dr hab. Rafał Wołosiak, prof. SGGW
Katedra Technologii i Oceny Żywności
Zakład Oceny Jakości Żywności
Instytut Nauk o Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 166
07-787 Warszawa

R E C E Z J A

rozprawy doktorskiej **mgr. inż. Kacpra Romana Kuta**
pt. **„Wybrane aspekty metodyczne oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej produktów
żywnościowych zawierających białka i polifenole”**
zrealizowanej w Instytucie Technologii Żywności i Żywienia,
na Wydziale Technologiczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego
pod kierunkiem prof. dr hab. Izabeli Sadowskiej-Bartosz

Podstawa prawna przygotowania recenzji: Uchwała nr 7/06/2025 Rady Dyscyplin Rolnictwo i ogrodnictwo oraz Technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 30 czerwca 2025 r.

Ocena właściwości przeciwutleniających składników żywności, a także innych źródeł materiału biologicznego weszło już do kanonu badań w tych obszarach. Stało się tak z jednej strony ze względu na istotną rolę procesów oksydacyjnych i aktywności przeciwutleniaczy w utrzymaniu homeostazy organizmów tlenowych w naturze, a z drugiej strony ze względu na zainteresowanie poznaniem aktualnych potrzeb człowieka uwzględniających styl życia i poznaniem dobrych źródeł naturalnych przeciwutleniaczy – w swoim dobrze pojętym interesie. Wyniki tych badań były początkowo na ogół dość oczywiste, a liczba dostępnych metod ograniczona. Jednak z czasem i wraz z postępem wiedzy pojawiło się sporo wątpliwości dotyczących samych procedur badawczych i znaczenia rezultatów ich aplikacji, a także sporo nowych możliwości badawczych. Recenzowana praca wpisuje się w ten właśnie zakres dociekań – niejednoznaczności wyników uzyskiwanych w badaniach złożonych ekstraktów uzyskiwanych ze źródeł naturalnych, potencjalnej interferencji w procedurach analitycznych czy wpływie przygotowania próbek lub warunków prowadzenia analiz na ich wyniki.

Formalna ocena pracy

Przedłożona rozprawa doktorska zrealizowana jest w formie cyklu trzech publikacji z lat 2023-2024:

1. Kut K., Tama A., Furdak P., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. 2024: Generation of hydrogen peroxide and phenolic content in plant-material-based beverages and spices. *Processes*, 12(1), 166

IF₂₀₂₃ = 2,8, MNiSW = 70 pkt

2. Kut K., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. 2023: Denaturation and digestion increase the antioxidant capacity of proteins. *Processes*, 11(5), 1362

IF₂₀₂₃ = 2,8, MNiSW = 70 pkt

3. Kut K., Stefaniuk I., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. 2023: Formation of a purple product upon the reaction of ABTS radicals with proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8912

IF₂₀₂₃ = 4,9, MNiSW = 140 pkt

Rozprawę doktorską stanowi maszynopis, który obejmuje 121 stron tekstu (67 bez Aneksu). W jego skład wchodzi 12 numerowanych rozdziałów:

1. Informacje wprowadzające
2. Streszczenie w języku polskim
3. Streszczenie w języku angielskim
4. Wykaz skrótów
5. Wstęp
6. Cel i zakres pracy
7. Materiały i metody
8. Wyniki
9. Dyskusja wyników
10. Wnioski
11. Bibliografia
12. Aneks (zawierający m.in. teksty publikacji wchodzących w skład rozprawy i oświadczenia autorów).

Układ rozprawy doktorskiej jest przejrzysty i zgodny z oczekiwaniami, jakie stawia się tego typu monografiom. Rozdział *Informacje wprowadzające*, poza wykazem trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, przedstawia miejsce realizacji badań i ich finansowanie, pozostałe publikacje Kandydata do stopnia doktora, a także wykaz trzech posterów zaprezentowanych na konferencjach naukowych, w tym dwóch międzynarodowych. Wykaz pozostałych publikacji liczy cztery pozycje. Są to prace opublikowane w czasopismach: *Processes*, *Natural Product Research* i *International Journal of Molecular Sciences*. Ich łączny IF wynosi 13,1, co jest dobrym osiągnięciem.

Wstęp stanowi krótkie wprowadzenie do problematyki reaktywnych form tlenu i reakcji oksydacyjnych, roli związków fenolowych i białek w tych procesach, a także podstawowych interakcji pomiędzy rodnikami a antyoksydantami. Rozdział *Cel i zakres pracy* przedstawia jej zakres realizowany w formie dwóch części. Pierwsza z nich dotyczy związków fenolowych w naparach roślinnych. Celem tej części było określenie zależności pomiędzy zawartością tych związków a ilością generowanego nadtlenu wodoru oraz wpływu tych wartości na całkowitą aktywność przeciwutleniającą naparów oznaczaną różnymi metodami. Druga część pracy obejmuje badania wybranych uwarunkowań oznaczania aktywności przeciwutleniającej białek, przede wszystkim metodą z ABTS. W ramach pierwszej części sformułowano dwie hipotezy badawcze:

1. Polifenole obecne w roślinnych naparach mogą jednocześnie generować i neutralizować nadtlenek wodoru w wyniku autooksydacji, co znacząco wpływa na ocenę ich właściwości antyoksydacyjnych.
2. Ilość nadtlenu wodoru powstającego w ekstraktach może stanowić przybliżoną miarę zawartości związków fenolowych.

W ramach drugiej części sformułowano jedną hipotezę badawczą, choć lepiej byłoby rozdzielić ją na dwie różne:

3. Zarówno denaturacja, jak i enzymatyczne trawienie białek mogą znacząco zwiększyć ich potencjał antyoksydacyjny, a powstanie fioletowej barwy w reakcji ABTS* z białkiem jest uzależnione od zawartości reszt tyrozyny w białkach i może wpływać na dokładność i wiarygodność uzyskiwanych wyników.

Materiał badawczy opisany jest dość skrótowo, brakuje mi np. informacji nt. użytych kaw – czy były to kawy ziarniste, mielone czy rozpuszczalne? Podobnie oszczędna miejscami jest część opisująca metody badań – trudno się chociażby dowiedzieć, w jaki sposób były przygotowywane próbki do oceny wizualnej i badań spektralnych po reakcji z ABTS** w publikacji 3. Nie najszcześniejsze wydaje mi się nazwanie przez Doktoranta „czasem zerowym” czasu „około 15 min po zalaniu próbki wrzącą wodą” – moim zdaniem znacznie lepiej byłoby wystandaryzować ten czas na 15 min i tak to właśnie ująć w pracy. Pomimo takiej praktyki stosowanej niekiedy w międzynarodowej literaturze, nie mogę także pominąć nazywania przez Pana Magistra „polifenolami” wszystkich związków fenolowych stosowanych w pracy. Niektóre z nich są oczywiście polifenolami (więcej niż jeden pierścień fenolowy, np. kwercetyna), lecz wielokrotne grupy hydroksylowe w takich związkach, jak pirogalol czy kwas galusowy, ściśle rzecz biorąc trzeba by raczej określić jako przynależące do polihydroksybenzenu niż polifenolu. Znacznie bezpieczniej określać wszystkie te związki jako „związki fenolowe” (*phenolics* lub *phenolic compounds*).

W części zatytułowanej *Wyniki* Kandydat przedstawił opublikowane w artykułach rysunki lub tabele i krótko opisał uzyskane rezultaty. Stosowane w tej części określenie „roślinne napary i przyprawy” należałoby skrócić do „roślinnych naparów” lub „badanych naparów” – użyte przyprawy to także materiał roślinny i także wykonano z nich napary. Podobnie niepotrzebnym komplikowaniem jest określenie „ekstrakty z ziół i przypraw leczniczych” – czy przyprawą leczniczą jest pieprz, kminek czy kolendra? Jakie jest kryterium odróżniające przyprawy lecznicze od zwykłych?

Pewna skrótowość wyżej omówionego rozdziału jest zrozumiała biorąc pod uwagę fakt, że następuje po nim część *Dyskusja wyników*. Zawiera ona, poza przedyskutowaniem badań własnych z informacjami dostępnymi już w literaturze, także rozszerzenie omówienia wyników, np. poprzez

przedstawienie wyników statystycznej analizy rezultatów własnych. W takiej sytuacji rozważyłbym na przyszłość połączenie obu tych rozdziałów.

Tę część pracy kończą rozdziały *Wnioski i Bibliografia*. W pracy sformułowano 5 stwierdzeń i wniosków. Dwa pierwsze odnoszą się do części badań skupiającej się na związkach fenolowych. W drugim z nich Kandydat podaje, że *niezbędne jest korzystanie z wielu metod oznaczania TAC oraz ich odpowiednia interpretacja, zwłaszcza przy analizie materiałów o złożonym składzie, takich jak produkty żywnościowe – różne metody oznaczania (ABTS, FRAP, CUPRAC, DPPH) różnią się selektywnością i wrażliwością – nie powinny być stosowane zamiennie bez kalibracji*. Wydaje się, że ta druga część nie wynika z badań własnych, więc informacja ta nie powinna być w ten sposób użyta we wniosku z pracy. Poza tym lepszym argumentem byłyby chyba różnice w mechanizmach reakcji i pH środowiska w wykorzystywanych metodach. Na marginesie dodam, że wyniki byłyby ciekawsze, a wnioski jeszcze silniejsze, gdyby poza metodami opartymi całkowicie (FRAP, CUPRAC) i częściowo (ABTS, DPPH) na mechanizmie SET zastosować także w badaniach metodę opartą całkowicie na mechanizmie HAT.

Trzy kolejne wnioski dotyczą części pracy opartej na badaniach aktywności przeciwutleniającej białek, przede wszystkim metodą z ABTS. Odnosząc się do wniosku 3. chciałbym zwrócić uwagę Kandydata, że denaturacja nie jest procesem technologicznym żywności, a wpływ ekspozycji reszt aminokwasowych cysteiny, tryptofanu i tyrozyny na aktywność nie wynika z Pana badań, więc tworząc taki wniosek lepiej byłoby posłużyć się słowem „najprawdopodobniej”. Chciałbym wyrazić także wątpliwość odnośnie do wniosku 4. – na podstawie czego Kandydat uważa, że tworzenie fioletowego adduktu pomiędzy białkami i ABTS** może fałszować wynik oznaczenia aktywności tą metodą?

W pracy zabrakło mi (poza celami szczegółowymi) ogólnego celu całości badań składających się na rozprawę doktorską i w konsekwencji jednego, końcowego wniosku, ujmującego w syntetyczny sposób kwestie poruszone w badaniach. Zabrakło mi także jednoznacznego rozstrzygnięcia przedstawionych hipotez badawczych.

Dysertacja kończy się oświadczeniami autorów publikacji składających się na rozprawę doktorską. Wynika z nich, że Kandydat miał odpowiednio znaczący i istotny udział w ich powstaniu – począwszy od prac koncepcyjnych, poprzez wykonanie części badań i analizę wyników, do współudziału w przygotowaniu publikacji. Doktorant był pierwszym autorem każdej z nich, lecz nie był autorem korespondencyjnym.

Na zakończenie tej części mojej recenzji chciałbym odnieść się do strony językowej rozprawy. Przygotowując tekst doktoratu, Kandydat powinien potraktować tę stronę swojej pracy z większą uwagą. W tekście znaleźć można sporo błędów interpunkcyjnych. W części tekstu znajdują się niewłaściwe odniesienia do rysunków, prawdopodobnie na skutek dołożenia jednego z nich i nieskorygowania numerów rysunków przywołanych w dalszej części rozdziału. Występują także niepoprawnie sformułowane zdania, które sprawiają wrażenie, jakby nie zostały uważnie przeczytane po poprawkach. Dla zilustrowania tych ostatnich, przytaczam poniżej kilka przykładów z różnych rozdziałów.

Mechanizm reakcji SET można przedstawić na przykładzie metody, w której antyoksydant redukuje rodnik kationowy ABTS, zmniejszając jego intensywne zabarwienie zielononiebieskie, odbarwienie, ta zmiana jest mierzona spektrofotometrycznie.*

Praca składa się z dwu komplementarnych części, obejmujących charakterystykę aktywności antyoksydacyjnej) wybranych białek i związków polifenolowych oraz analizę metodycznych aspektów jej oznaczania aktywności antyoksydacyjnej w produktach żywnościowych zawierających te związki.

Spośród przypraw i ziół najwyższe wartości odnotowano w rozmarynie (...) i tymianek (...). Najniższą aktywność, kakao, pieprz zielony i czarny, kminek, chili, oraz kolendra (...).

Różnica pomiędzy czasem zerowym i po 1h stężenie nadtlenu wodoru w ekstraktach.

Merytoryczna ocena pracy

Trzy recenzowane publikacje naukowe, stanowiące podstawę do ubiegania się przez Kandydata o stopień doktora, uważam za wartościowe. W pierwszej z nich poruszono kwestię różnorodnej aktywności wodnych ekstraktów suszonych produktów spożywczych pochodzenia roślinnego, zawierających m.in. związki fenolowe. Przebadano w niej także aktywność wobec kationorodników ABTS i rodników DPPH oraz zdolność redukcyjną metodami FRAP (pH kwasowe) i CUPRAC (pH obojętne). Następnie zbadano zawartość nadtlenu wodoru w ekstraktach bezpośrednio po wytworzeniu i po jednej godzinie od wytworzenia. Uzyskano ciekawe wyniki, które sugerują dalsze badania. Gdyby powstawanie nadtlenu wodoru zdefiniować wyłącznie jako powstawanie w czasie, to wyniki jego zawartości netto (stan po 1 h skorygowany o stan początkowy) sugerowałyby tworzenie się tego związku podczas doświadczenia w praktyce wyłącznie w ekstrakcie zielonego pieprzu. Zjawisko to jest podstawą do dalszych dociekań: na ile to związki fenolowe w takich ekstraktach odpowiadały za obecność nadtlenu wodoru, szczególnie na początku doświadczenia? W ekstraktach były bez wątpienia obecne także inne składniki. Autorzy przebadali aktywność różnych stężeń czystych związków fenolowych w tworzeniu i zmiataniu nadtlenu wodoru w warunkach doświadczenia. Wykazano dość stabilne podtrzymywanie w czasie stężenia nadtlenu wodoru przy średnich zawartościach badanych związków, lecz w próbkach z żadnym z dwóch powszechnie występujących w żywności fenoli (czyli z wyjątkiem pirogalolu) nie stwierdzono istotnych ilości tego związku bezpośrednio po zainicjowaniu doświadczenia. Wyrażna zależność powstającego nadtlenu wodoru od zawartości związku aktywnego ciekawie ilustruje antyoksydacyjno-prooksydacyjną dwoistość działania przeciwutleniaczy przy różnych stężeniach – lub inaczej rzecz ujmując – *drugą twarz* przeciwutleniaczy.

Ciekawy jestem zdania Kandydata nt. możliwej interferencji ze strony innych składników ekstraktów, np. jonów metali. Zastosowany do wykrywania nadtlenu wodoru oranż ksylenolowy stosowany jest także do wykrywania jonów metali, np. wapnia. Ciekawe też jest, czy zdolność związków fenolowych do redukcji i chelatowania jonów żelaza mogła wpłynąć na wyniki reakcji. Kwestia powstawania i zmiatania nadtlenu wodoru przez związki obecne w żywności jest warta dalszych dociekań i szczegółowego rozpoznania tych kwestii.

W kolejnej publikacji podjęto tematykę wpływu modyfikacji białek na ich aktywność przeciwutleniającą badaną 1) metodą z ABTS, która wykorzystuje mieszane mechanizmy dezaktywacji rodników w zależności od charakteru przeciwutleniaczy i warunków środowiska reakcji, na ogół ze znaczną przewagą mechanizmu SET, 2) metodą FRAP (czysty mechanizm SET w środowisku kwaśnym, odpowiadającym żywności) i 3) metodą CUPRAC (czysty mechanizm SET w środowisku obojętnym, przybliżającym warunki do fizjologicznych). Modyfikacja białek polegała na zastosowaniu warunków denaturujących bez ograniczenia rozpuszczalności (zastosowano dodatek SDS) i hydrolizy

enzymatycznej (papainą oraz trypsyną). Zaobserwowano wyraźny, korzystny wpływ obecności SDS, szczególnie przy badaniu aktywności metodą dopuszczającą łączone mechanizmy dezaktywacji. Hydroliza enzymatyczna w zastosowanych warunkach nie dała tak wyraźnych rezultatów – jedynie po hydrolizie białek jaja kurzego papainą zaobserwowano znaczący wpływ procesu.

W badaniach aktywności antyoksydacyjnej aminokwasów i białek lub produktów ich hydrolizy sugerowałbym Panu Magistrowi na przyszłość wzięcie także pod uwagę sekwencji aminokwasów w łańcuchu peptydowym (w tym nie tylko aminokwasów wykazujących aktywność indywidualnie) – jest to kwestia konsekwentnie pomijana przez Kandydata w omawianiu i dyskutowaniu wyników, a bardzo istotna dla działania antyoksydacyjnego aminokwasów w peptydach. W żywności generalnie aminokwasy występują samodzielnie w bardzo nieznacznych ilościach.

W trzeciej publikacji podjęto ciekawą problematykę barwnego kompleksu powstającego podczas reakcji białek z ABTS^{•+}. Zjawisko to było znane już wcześniej, lecz Kandydat ze Współautorami poddali je dogłębnej charakterystyce. Potwierdzili kluczową rolę tyrozyny, aminokwasu o właściwościach przeciwutleniających, w tworzeniu proponowanego adduktu. Porównali widma absorpcyjne w świetle widzialnym kationorodników ABTS i produktu ich reakcji z BSA, pokazując wyraźne przesunięcie głównego maksimum absorpcyjnego rodników, leżącego blisko granicy ultrafioletu, w kierunku fal dłuższych, a także brak interferencji spektralnej powstałego produktu z maksimum absorpcji ABTS^{•+} typowo stosowanym w badaniach żywności (powyżej 700 nm). Pokazano (niemal liniowy) charakter zależności intensywności powstawania nowego kompleksu od zawartości kationorodników w środowisku reakcji, a także porównano intensywność jego powstawania w przypadku różnych białek lub ich hydrolizatu. W celu lepszej charakterystyki produktu zweryfikowano także wpływ silnych, laboratoryjnych czynników redukujących, reakcji nitrowania grup hydroksylowych tyrozyny i pH środowiska reakcji na jego powstawanie. Porównano także spektra absorpcyjne i emisyjne tyrozyny i powstającego produktu reakcji, a przy pomocy EPR wykazano, że roztwór zawierający barwny addukt nie generuje sygnału charakterystycznego dla wolnych rodników.

W tej części zabrakło mi jasnego opisanie sposobu przygotowania próbek do wizualizacji wyglądu mieszaniny reakcyjnej w różnych warunkach oraz próbek służących do zebrania danych spektroskopowych, o czym wspominałem wcześniej. Bez znajomości składu mieszaniny poddanej badaniom trudno jest analizować, czy jakieś składniki towarzyszące mogły mieć wpływ na zarejestrowane widma.

W opisie swoich wyników Doktorantowi zdarzyły się niekiedy małe lapsusy, jak np. stwierdzenie, że absorbancja przy 734 nm w mieszaninie ABTS^{•+} z BSA wzrastała w sposób liniowy (str. 39), czy informacja, że w przypadku wszystkich próbek obserwowano wzrost absorbancji wraz ze wzrastającą objętością roztworu białka, który w większości przypadków uległ nasyceniu przy wyższych objętościach (str. 40) – omówione zjawiska odnoszą się w praktyce tylko do jednej z czterech próbek, w pozostałych raczej należało podkreślić bardzo niewielką zależność absorbancji od stężenia. Co więcej, Kandydat powinien uniknąć pisania o odnotowanej najwyższej (czy jakiegokolwiek innej) korelacji przy braku jej statystycznej istotności we wszystkich omawianych przypadkach (str. 48). Jednak uwagi przedstawione powyżej i w części dotyczącej oceny formalnej rozprawy nie umniejszają wartości publikacji stanowiących sedno zrealizowanych badań, a wyjaśnienia poruszonych w recenzji kwestii spodziewam się podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej Pana Magistra.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego wpływu czynników związanych z doborem metod badawczych, przygotowaniem materiału do doświadczeń i współwystępowaniem różnych procesów podczas prowadzenia oznaczeń aktywności przeciwutleniającej składników żywności. Przedstawione w dysertacji badania są zróżnicowane pod względem zakresu. Wykorzystano w nich adekwatny do postawionych zadań sprzęt analityczny. Postawione w pracy cele należy uznać za zrealizowane. Publikacje naukowe, które były podstawą przygotowania rozprawy doktorskiej, są w moim odczuciu wartościowe i będą stanowiły dobre źródło informacji dla innych badaczy oraz inspirację do dalszych badań.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Kacpra Romana Kuta pt. „Wybrane aspekty metodyczne oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej produktów żywnościowych zawierających białka i polifenole” spełnia wymagania zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz. 1897), co pozwala mi wnioskować do Rady Dyscyplin Rolnictwo i ogrodnictwo oraz Technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie Pana Magistra Kacpra Romana Kuta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopień doktora.