UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD BOTANIKI FARMACEUTYCZNEJ I BIOTECHNOLOGII ROŚLIN

ul. św. Marii Magdaleny 14
61-861 Poznań

tel. 061 668 78 47 (48)
fax 061 668 78 61
e-mail: jbudzian@ump.edu.pl

Recenzja rozprawy w przewodzie doktorskim pt.:
"Kultury in vitro *Nasturtium officinale* R. Br. jako potencjalne źródło biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych i biopierwiastków"
wykonanej przez mgr Martę Klimek-Szczykutowicz
pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Szopy
w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum

OCENA FORMALNA

Rozprawa doktorska ma formę powiązanego tematycznie cyklu opublikowanych artykułów i składa się z 8 publikacji ogłoszonych w latach 2018-2021, w tym 2 prac przeglądowych i 6 prac doświadczalnych, których dane bibliograficzne i bibliometryczne podane są poniżej (* autor korespondencyjny).

Prace przeglądowe

1. Klimek-Szczykutowicz M*, Szopa A, Ekiert H. 2018, Chemical composition, traditional and professional use in medicine, application in environmental protection, position in food and cosmetics industries, and biotechnological studies of *Nasturtium officinale* (watercress) – a review. Fitoterapia, 129:283-292, DOI:10.1016/j.fitote.2018.05.031, IF=2,431, MNiSW=30 pkt (wg. punktacji z 2018 roku)
2. Klimek-Szczykutowicz M*, Szopa A, Ekiert H. 2018, *Nasturtium officinale* (rukiew wodna) – źródło surowców roślinnych o cennych walorach kosmetycznych, leczniczych i prozdrowotnych. Polish Journal of Cosmetology, 21(4):290-299, MNiSW=7 pkt

Oryginalne prace doświadczalne

1. Klimek-Szczykutowicz M*, Szopa A*, Blicharska E, Dziurka M, Komsta Ł, Ekiert H. 2019, Bioaccumulation of selected macro- and microelements and their impact on antioxidant properties and accumulation of glucosinolates and phenolic acids in in vitro cultures of *Nasturtium officinale* (watercress) microshoots. Food Chemistry, 300:125184 DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125184, IF=6,306, MNiSW= 200 pkt
2. Klimek-Szczykutowicz M, Szopa A*, Dziurka M, Komsta Ł, Tomczyk M, Ekiert H. 2020, The influence of *Nasturtium officinale* R. Br. agar and agitated microshoot culture media on glucosinolate and phenolic acid production, and antioxidant activity. Biomolecules, 10:1216 DOI:10.3390/biom10091216, IF=4,082, MNiSW=100 pkt
3. Klimek-Szczykutowicz M, Dziurka M, Blažević I, Đulović A, Granica S, Korona Głowniak I, Ekiert H, Szopa A.* 2020, Phytochemical and biological activity studies on *Nasturtium officinale* (watercress) microshoot cultures grown in RITA® temporary immersion systems. Molecules, 25:5257 DOI: 10.3390/molecules25225257, IF=3,267, MNiSW=100 pkt
4. Klimek-Szczykutowicz M, Prokopiuk B, Dziurka K, Pawłowska B, Ekiert H, Szopa A.* 2021, The influence of different wavelengths of LED light on the production of secondary metabolites and the antioxidant potential of *Nasturtium officinale* (watercress) in vitro cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, (przyjęte do druku), IF=2,196, MNiSW=100 pkt
5. Klimek-Szczykutowicz M, Dziurka M, Blažević I, Đulović A, Apola A, Ekiert H, Szopa A.* 2021, Impact of treatments with elicitors on metabolite production and on antioxidant and tyrosinase inhibition power in *Nasturtium officinale* (watercress) microshoot cultures. Applied Microbiology and Biotechnology (under review), IF=3,530, MNiSW=100 pkt
6. Klimek-Szczykutowicz M, Dziurka M, Blažević I, Đulović A, Miazga-Karska M, Klimek K, Ekiert H, Szopa A.* 2021, Precursor-boosted production of metabolites in *Nasturtium officinale* microshoots

grown in Plantform bioreactors, and antioxidant and antimicrobial activities of biomass extracts. Molecules (przyjęte do druku), IF=3,267, MNiSW=100 pkt

Rozprawa doktorska składa się z kopii wyżej wymienionych publikacji, oraz rozdziałów, które w zwięzły i syntetyczny sposób przedstawiają podstawy teoretyczne i wyniki zawarte w publikacjach doktorskich z dyskusją i odniesieniami do literatury naukowej.

W trakcie przygotowywania niniejszej recenzji, publikacje wymienione w punktach 4 i 6 zostały przyjęte do druku (27.07.2021).
Sumaryczny Impact Factor prac opublikowanych (bez pracy, która ma status – under review) wynosi IF=21,549; sumaryczna punktacja MNiSW wynosi 637 pkt.

Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji, oraz autorem korespondencyjnym w trzech publikacjach. Z oświadczeń doktorantki i współautorów tych publikacji wynika, że udział doktorantki jest dominujący.
Wkład doktorantki w cyklu publikacji polegał na przeprowadzeniu prac doświadczalnych dotyczących kultur in vitro, analiz chromatograficznych (HPLC), które, jak i wszystkie inne analizy, musiały być poprzedzone przygotowaniem ekstraktów z licznych próbek materiału roślinnego, udziale w przeprowadzeniu badań biologicznych oraz udziale w opracowaniu powstałych wyników.
Z kolei udział współautorów tych publikacji polegał na wykonaniu, bądź pomocy w wykonaniu, specyficznych doświadczeń wymagających szczególnej wiedzy, doświadczenia i aparatury, jak analiza glukozynolatów czy związków fenolowych metodą spektrofotometryczną i UHPLC-DAD-MS/MS, analiza bioakumulacji pierwiastków metodą ASA, analiza aktywności przeciwdrobnoustrojowej, przeciwzapalnej, wpływu na aktywność tyrozynazy i cytotoksyczności.

Publikacje przeglądowe pokrywają część teoretyczną rozprawy doktorskiej, natomiast publikacje oryginalne zawierają całość części doświadczalnej tej rozprawy. Opracowanie spina te części w jedną całość, stanowiąc komentarz i podsumowanie wyników opisanych w publikacjach. Tak więc rozprawa doktorska ma najlepszą możliwą formę, gdyż została w całości opublikowana w punktowanych czasopismach, zakładając, że jedna praca będąca w recenzji zostanie przyjęta do druku.

OCENA MERYTORYCZNA

Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Tytułowa roślina – *Nasturtium officinale* R. Br. (rukiew wodna) z rodziny Brassicaceae (kapustowate) jest równocześnie rośliną jadalną, leczniczą i kosmetyczną. Jako roślina jadalna i lecznicza, znana od czasów starożytnych, współcześnie jest sklasyfikowana na pierwszym miejscu w rankingu zdrowej żywności, roślin o dużej gęstości odżywczej, wg Amerykańskiego Centrum Kontroli Chorób i Prewencji (CDC) [Di Noia, 2017]. Jako roślina lecznicza (surowiec Nasturtii herba – ziele rukwii wodnej) stosowana jest jako środek w dolegliwościach dróg oddechowych i zakażeniach dróg moczowych i wymieniana jest m.in. w monografiach Niemieckich Komisji E i D, ale w świetle współczesnych badań na czoło wysuwa się działanie prozdrowotne, zwłaszcza chemoprewencyjne, zapobiegające rozwojowi chorób nowotworowych. Jako roślina kosmetyczna wymieniona jest zarówno w bazie INCI, jak i w bazie CosIng Komisji Europejskiej, a wyciągi z niej są składnikami preparatów krajowych i zagranicznych. Może być zastosowana do fitoremediacji, gdyż stwierdzono jej zdolność do usuwania ze środowiska jonów toksycznych metali – Cu, Ni, Zn, Cd, Co, Cr, As, U.

Składnikami chemicznymi *N. officinale* są głównie glukozynolaty, czyli związki charkterystyczne dla rodziny Brassicaceae – 8 związków (głównie glukonasturtyna), izotiocyjaniany – produkty enzymatycznego rozszczepienia wspomnianych glukozynolatów (np. izotiocyjanian fenyloetylu - produkt glukonasturtyny) przez mirozynazę aktywną w rozerwanych komórkach roślinnych, jak i występującą w drobnoustrojach ludzkiej flory jelitowej (np. z rodzajów *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus* i *Escherichia*), następnie flawonoidy, kwasy fenolowe, olejek

eteryczny (mono-, seskwi- i diterpeny), witaminy, biopierwiastki, białka, kwasy tłuszczowe nienasycone i (niewiele) węglowodany.

Gatunek jest szybkorosnącą byliną występującą w stanie naturalnym w płytkich, wolnopłynących wodach. Trudno dostępny ze stanu naturalnego ze względu na status rośliny zagrożonej lub częściowo zagrożonej (w Polsce), może być uprawiany, co wymaga odtworzenia specyficznych warunków środowiskowych. Może być także pozyskiwany metodami biotechnologii roślin, co pozwala, w wysoce kontrolowany sposób, niezależnie od środowiska, klimatu i pogody, uzyskiwanie materiału roślinnego o stabilnym, zdefiniowanym składzie chemicznym i właściwościach biologicznych.

Poprzednie badania biotechnologiczne *Nasturtium officinale,* opisane w literaturze naukowej, dotyczyły (i) mikrorozmnażania z istniejących merystemów [Wainwright et al. 1985] lub w drodze somatycznej embriogenezy [Wainwright et al. 1989], (ii) hodowli korzeni włośnikowatych powstałych przez transformację *Agrobacterium rhizogenes* i biosyntezy glukozynolatów w tych korzeniach, w tym z prekursorów [Wielanek et al. 2009; Park et al. 2011], (iii) kultur mikropędowych z nieudaną elicytacją produkcji glukozynolatów [Rubin et al. 2018].

Oceniana rozprawa doktorska obejmuje: (i) badania biotechnologiczne dotyczące kultur mikropędowych - agarowych, płynnych (wytrząsanych) i bioreaktorowych w dwóch różnych bioreaktorach komercyjnych, przyrostu biomasy i produkcji metabolitów i wpływu na nie regulatorów wzrostu, elicytorów, prekursorów i rodzaju światła, akumulacji pierwiastków prozdrowotnych; (ii) badania fitochemiczne dotyczące analizy jakościowej i ilościowej glukozynolatów, fenoli całkowitych, fenolokwasów, flawonoidów, barwników fotosyntetycznych, sacharydów, pierwiastków metali; (iii) badania aktywności biologicznej ekstraktów z kultur mikropędowych, w tym potencjału antyoksydacyjnego, aktywności przeciwdrobnoustrojowej, przeciwzapalnej, hamowania tyrozynazy oraz cytotoksyczności.

W świetle powyższych danych, zarówno wybór rośliny, jak i zakres szeroko założonych badań własnych, jest bardzo trafny, w pełni uzasadniony i wielce oryginalny.

Ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki
Ocena szczegółowa
Kultury in vitro *Nasturtium officinale* wyprowadzono z nasion z Ogrodu Roślin Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Collemium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Z tej samej lokalizacji zebrano też rośliny określane dalej jako roślina macierzysta. Nasiona wysterylizowano powierzchniowo 0,1% $HgCl_2$ i skiełkowano na pożywce Murashige-Skooga (MS) po 1 tygodniu; pędy uzyskano po 2 tygodniach. Prowadzono kultury na pożywce stałej (agarowe) stosując 30 ml pożywki/kolbę oraz kultury na pożywce płynnej (wytrząsane) stosując 50 ml pożywki/kolbę.
W celu optymalizacji kultur agarowych przebadano 27 wariantów pożywek MS z regulatorami wzrostu – 4 cytokininami (BA, 2iP, Kin, Zea) i 5 auksynami (IAA, IBA, IPA, 2,4-D, NAA).
W celu optymalizacji kultur wytrząsanych przebadano 6 wariantów pożywek MS z 4 cytokininami i 3 auksynami (IAA, IBA, NAA).
Uzyskano następujące wyniki optymalizacji kultur mikropędowych, odpowiednio dla kultur agarowych i wytrząsanych: przyrost biomasy: Gi (indeks wzrostu) = 5,05 i 10,48; zawartość glukozynolatów (spetrofotometrycznie w ekwiwalentach synigryny – mg SIN/100 g s.m.) – 194,77 mg po 30 dniach oraz 182,80 mg po 10 dniach hodowli (roślina macierzysta [ziele] zawierała 499.89 mg/100g); zawartość kwasów fenolowych (metodą HPLC-DAD) – 10 związków (roślina macierzysta 7 związków) – 237,52 mg i 236,74 mg (roślina macierzysta 99,84 mg/100 g s.m.); zawartość polifenoli (metodą z odczynnikiem Folin-Ciocalteu, w ekwiwalentach troloksu - mM TE/100 g s.m.) – 8,69 i 5,24 (roślina macierzysta 3,2 razy mniej); potencjał antyoksydacyjny (metodami CUPRAC, DPPH, FRAP) – 1,2, 1,2 i 1,9 razy wyższy od rośliny macierzystej.

W sumie przebadano 78 wariantów hodowli i ustalono, że optymalna pożywka do dalszych badań kultur mikropędów *N. officinale* to MS z dodatkiem cytokininy 1 mg/L benzyloadeniny (BA) i auksyny 1 mg/L kwasu naftylooctowego (NAA).

W kulturze agarowej mikropędów przebadano wpływ światła LED o różnej długości fali na biomasę, produkcję metabolitów i potencjał antyoksydacyjny. Zastosowano 10 wariantów oświetleniowych, w tym 8 wariantów oświetlenia LED: światło niebieskie (B), czerwone (R), i zmieszane w określonych proporcjach procentowych - BR, to ostatnie również z światłem zielonym (G) – RBG, z żółtym (Y) – RBY, światło białe WLED oraz kontrolne białe fluorescencyjne (WF) i ciemność. Uzyskano następujące wyniki: biomasa – wpływ stymylujący, np. Gi=13,38, 11,81, 8,25 odpowiednio w świetle RBY, RBG i RB; glukozynolaty – 5,8 razy i 1,8 razy więcej w RBG niż w WF i WLED; polifenole – brak wpływu; flawonoidy (oznaczone spektrofotometrycznie w metodzie z $AlCl_3$) – wzrost w RBY 1,4 i 1,1 razy niż kontrola; barwniki fotosyntetyczne (chlorofile a i b, karotenoidy; oznaczone spektrofotometrycznie) – wzrost w świetle RB i B; sacharydy (oznaczone metodą z fenolem i kwasem siarkowym jako g glukozy/100 g s.m.) – spadek zawartości w świetle LED; potencjał antyoksydacyjny – niewielki wpływ światła LED korelujący z brakiem wpływu na zawartość polifenoli.

W następnych badaniach analizowano wpływ elicytorów na biomasę, produkcję metabolitów, potencjał antyoksydacyjny i aktywność hamowania tyrozynazy w kulturach wytrząsanych mikropędów prowadzonych na pożywce MS z dodatkiem 1 mg/L BA i 1 mg/L NAA w oświetleniu WLED. Zastosowano elicytory abiotyczne – etefon (ETH), jasmonian metylu (MeJA), salicylan sodu (NaSA) w stężeniach 50 i 100 µM oraz elicytor biotyczny - ekstrakt drożdżowy (YeE). Uzyskano następujące wyniki: biomasa – Gi=31.71, jak w bioreaktorze RITA® (o czym poniżej), czyli 1,2 i 1,1 razy więcej niż kontrola; glukozynolaty (spektrofotometrycznie i UHPLC-DAD-MS/MS) – 9 związków, najwięcej 4-metoksyglukobrassycyny, wzrost glukonasturcyny (3,0 razy) i glukobrassycyny (1,4 razy); polifenole – brak wpływu; flawonoidy – wzrost 1,4 razy i 2,4 razy po NaSA 100 (24h) i 50 µM (8 dni); barwniki fotosyntetyczne – wzrost po NaSA; sacharydy – wzrost po 50 µM NaSA; potencjał antyoksydacyjny – wzrost w teście CUPRAC i FRAP po MeJA oraz w teście DPPH po ETH; hamowanie tyrozynazy in vitro – po elicitacji 100 µM MeJA 27,84% 1250 µg/ml, jak kwas kojowy 5,5 µg/ml.

Kolejne badania dotyczyły kultur mikropędowych prowadzonych w komercyjnych bioreaktorach okresowo-zalewowych (typu TIS) RITA® (firma Vitropic, Francja), gdzie objętość pożywki wynosiła 200 ml/bioreaktor. Stosowano pożywkę MS z dodatkiem 1 mg/L BA i 1 mg/L NAA, światło WLED, cykl zanurzenia 5 min. co 1,5 h. Uzyskano następujące wyniki po 10 i/lub 20 dniach hodowli: biomasa Gi= 16,54 i 31,74 po 10 i 20 dniach; glukozynolaty (UHPLC-DAD-MS/MS) – 6 związków (3 śladowe) – 261,97 mg i 113,70 mg/100 g s.m. po 10 i 20 dniach hodowli (głównie glukonasturcyna - 182,93 mg, glukobrassycyna - 20,18 mg i 4-metoksyglukobrassycyna - 58,86 mg), roślina macierzysta – 8 związków (4 śladowe) - 799,47 mg (głównie glukonasturcyna - 640,94 mg); polifenole (Folin-Ciocalteu) – 3,74 mM TE/10g s.m., 1,4 razy więcej niż roślina macierzysta; flawonoidy (spektrofotometrycznie i UHPLC-DAD-MS/MS) – rutozyd 23,24 mg/100g – 3,2 razy więcej niż w roślinie macierzystej, gdzie głównym związkiem była izokwercetryna 57,05 mg; fenolokwasy – głównie kwas ferulowy 9,28 mg i *p*-kumarowy 1.26 mg, roślina macierzysta – głównie kwas protokatechowy 196,11 mg; potencjał antyoksydacyjny – CUPRAC i DPPH 1,4 i 1,2 razy niższy, FRAP porównywalny z rośliną macierzystą; działanie przeciwzapalne – hamowanie enzymów: COX-1 40% (jak roślina macierzysta, 1,9 razy silniejsze niż ibuprofen), COX-2 75% (1,8 razy silniejsze niż roślina macierzysta, 3,6 razy silniejsze niż ibuprofen), 15-LOX 15,9%, $sPLA_2$ 3,8%; działanie przeciwdrobnoustrojowe (bakterie G-: *E. coli, H. pylori, P. aeruginosa*; bakterie G+: *S. aureus, S. epidermis*; grzyby: *A. niger, C. albicans, C. parapsilosis, C. glabrata, M. canis, P. chrysogenum i T. mentagrophytes*) – MBC/MIC 2 (roślina macierzysta MBC/MIC 1); działanie przeciwgrzybicze: *C. albicans, C. parapsilosis, M. canis* i *T. mentagrophytes*.

Następne badania dotyczyły biosyntezy z prekursorów – L-fenyloalaniny (Phe) i L-tryptofanu (Trp), w kulturach mikropędowych prowadzonych w komercyjnych bioreaktorach okresowo-zalewowych (typu TIS) Plantform™ (firma PlantForm, Szwecja), gdzie objętość pożywki wynosiła 500 ml/bioreaktor. Stosowano znowu pożywkę MS z dodatkiem 1 mg/L BA i 1 mg/L NAA, światło WLED, cykl zanurzenia 5 min. co 1.5 h. Prekursory dodawano do pożywki w 5 różnych stężeniach w zakresie stężeń 0,05-3,0 mM, w zerowym („0") i 10-tym dniu hodowli. Uzyskano następujące wyniki: biomasa – Gi=11,48 i 13,66 po suplementacji Phe i Trp; glukozynolaty (spektrofotometrycznie i UHPLC-DAD-MS/MS) - 5 związków w kontroli (hodowla bez prekursorów), 6 związków po Phe 3,0 mM (269,20 mg SIN, główny związek 4-metoksyglukobrassycyna - wzrost 11,7 razy; glukonasturcyna - wzrost 2,3 razy), 4 związki po Trp 3,0 mM; flawonoidy – wzrost 2,4 i 2,2 razy po Phe 3,0 mM i Trp 1,0 mM (rutozyd – 4,2 razy więcej po Trp 0,1 mM); polifenole – wzrost 4,3 i 1,7 razy po Phe 3.0 mM i Trp 0,1 mM (kwas ferulowy, kwas p-kumarowy – 7,6 razy więcej po Phe 3,0 mM i 2,6 razy więcej po Trp 0,5 mM); barwniki fotosyntetyczne – chlorofile wzrost 1,7 – 2,2 razy po Trp, karotenoidy wzrost 2,9 razy po Phe; sacharydy - wzrost 1,5 razy po 0,1 mM Phe; potencjał antyoksydacyjny – wzrost w testach CUPRAC, DPPH, FRAP 2,0, 1,8 i 3,0 razy po Phe 3,0 mM; aktywność przeciwbakteryjna (test dyfuzyjny) - bakterie G- (*E. coli, P. aeruginosa*) – brak aktywności, bakterie G+ - najsilniej przeciw *Propionibacterium* spp – *P. acnes, P. granulosum*, 250-500 µg/ml, MBC/MIC >8; aktywność cytotoksyczna – brak hamowania żywotności fibroblastów w stężeniu 1,95 – 125,0 µg/ml, spadek ich żywotności do 92% w stężeniu 250 µg/ml.

Następne badania dotyczyły bioakumulacji biopierwiastków w biomasie mikropędów w kulturze wytrząsanej, po dodaniu do pożywki (bez regulatorów wzrostu) soli makroelementów: Ca i Mg i mikroelementów: Cr, Cu, Fe, Li, Se i Zn w stężeniach 1,5, 10, 25 i 50 mg pierwiastka/L pożywki. Po 14 dniach uzyskano następujące wyniki (metoda ASA): biomasa – obniżenie Gi po wysokich stężeniach Cr i Cu, maksymalny Gi = 11,65 po Li 50 mg/L, 1,1 razy więcej od kontroli; wzrost zawartości biopierwiastków największy dla Cr 50 mg/L – 8310,3 razy (498,62 mg/100 g), największy współczynnik biokoncentracji (BCF) dla Ca 1 mg/L – 4467,00 mg/100 g; glukozynolaty – największy wzrost, 1,2 razy, po Ca 1 mg/L – 172,90 mg/100 g; kwasy fenolowe – najwięcej po Fe 50 mg/L; potencjał antyoksydacyjny – CUPRAC wzrost 1,3 razy po Cu 1 mg/L, QUENCHER-CUPRAC wzrost 1,5 razy po Li 5 mg/L.

Podsumowanie oceny

Reasumując, w ocenianej rozprawie doktorskiej przeprowadzono rozległe, bardzo wnikliwe badania doświadczalne z zakresu biotechnologii roślin, których celem było prowadzenie kultur in vitro gatunku rośliny o cennych właściwościach biologicznych, jaką jest *Nasturtium officinale*, i przebadanie wpływu licznych czynników mogących mieć wpływ na rozwój biomasy, jak i produkcję w niej charakterystycznych metabolitów o znaczeniu leczniczym i prozdrowotnym. Należy podkreślić, że wpływ każdego czynnika przebadano indywidualnie i z tego względu w rozprawie przeprowadzono ścisłe i kompletne doświadczenie. Dodatkowo przeprowadzono badania wybranej aktywności biologicznej uzyskanej biomasy. Początkowo założono kultury in vitro mikropędów *Nasturtium officinale* na pożywce stałej (kultura agarowa) i na pożywce płynnej (kultura wytrząsana), w kolbach Erlemeyera, na pożywce o objętości odpowiednio 30 i 50 ml. Następnie prowadzono te kultury w powiększonej skali, w komercyjnych bioreaktorach (RITA i Plantform), o większej objętości pożywki płynnej, odpowiednio - 200 ml i 500 ml.

Zwraca uwagę szybki rozwój biomasy, szczególnie w kulturach wytrząsanych i w bioreaktorze RITA (Gi=31,71) i to w krótkim czasie - 10 do 20 dni. Skład jakościowy i ilościowy metabolitów produkowanych przez mikropędy (biomasę) analizowano nowoczesnymi metodami.

Uzyskane kultury mikropędów *N.officinale* wykazały wyraźne różnice składu metabolitów w porównaniu z rośliną macierzystą (ziele). W mikropędach zawartość glukozynolatów całkowitych była niższa (bioreaktor RITA – 261,97 mg/100 g s.m.; bioreaktor Plantform – 269,20 mg po suplementacji prekursorem biosyntezy – L-tryptofanem; kultury wytrząsane w kolbach Erlenmeyera – 320,60 mg po dodaniu elicytora – salicylanu sodu) niż w zielu – 799,47 mg/100 g. Również skład jakościowy

glukozynolatów był odmienny – w mikropędach głównymi związkami były glukonasturcyna (bioreaktor RITA – 182,93 mg) lub 4-metoksyglukobrassycyna (kultury wytrząsane – 152,91 mg; bioreaktor Plantform – 149,99 mg po suplementacji L-fenyloalaniną) i glukobrassycyna (kultury wytrząsane – 68,34 mg po elicytacji jasmonianem metylu). Natomiast w zielu dominowały: glukonasturcyna (640,94 mg), glukozynolat 7-metylosulfinyloheptylu (92,27 mg) i glukohirsutyna (42,79 mg) – te dwa ostatnie stwierdzono w śladowych ilościach w mikropędach. Ponadto, w mikropędach występowała 4-hydroksyglukobrassycyna (kultury wytrząsane – 12,00 mg), której praktycznie brak w zielu. Za to zawartość polifenoli całkowitych była wyższa w mikropędach, jak i sumy kwasów fenolowych, gdzie, tak jak w zielu, dominował kwas protokatechowy i galusowy (kultury wytrząsane), albo kwas ferulowy i p-kumarowy (bioreaktory). Zawartość flawonoidów całkowitych była niższa w mikropędach, ale można było ją znacznie zwiększyć powyżej zawartości w zielu przez elicytację salicylanem sodu lub suplementację prekursorem biosyntezy – L-fenyloalaniną. Zidentyfikowano 1 flawonoid – rutozyd, którego zawartość była wyższa niż w zielu, które zawierało dodatkowe 2 flawonoidy, a dominującym była izokwercytryna.
W pracy zbadano również akumulację biopierwiastków metali w mikropędach i ich wpływ na biomasę, skład i potencjał antyoksydacyjny.
Nie można powiedzieć, że różnice w składzie metabolitów uzyskanych mikropędów są niekorzystne, ponieważ w przypadku *N.officinale* aktywność biologiczna nie wydaje się zależeć od pojedynczego związku. W dodatku aktywność biologiczna wyciągów z kultur in vitro okazała się wyższa lub zbliżona do aktywności wyciągu z ziela rośliny macierzystej. Co najbardziej istotne, zmienność składu metabolitów, w zależności od planowo ustalanych warunków prowadzenia kultury, jest zasadniczą cechą biotechnologii roślin i zbadanie tych zależności jest główną zaletą ocenianej rozprawy.

Oceniana rozprawa doktorska stanowi znaczne osiągnięcie naukowe w obszarze biotechnologii roślin i naukach farmaceutycznych. Nie podważają tej opinii poniższe uwagi.
We wzorze strukturalnym 4-hydroksyglukobrassycyny pominięto grupę 4-OH (Ryc. 2, str. 18).
W opracowaniu brakuje komentarza na temat rozbieżności w zawartości glukozynolatów całkowitych w zielu rośliny macierzystej oznaczonej metodą spektrofotometryczną (499,89 mg SIN/100 g s.m.) i metodą UHPLC-DAD-MS/MS (799,47 mg SIN/100 g). Ta druga metoda wydaje się bardziej wiarygodna, ponieważ oznaczano nią pojedyncze związki, i jej wynik należało podać w tabeli 4 (str. 287).
Zawartość flawonoidów całkowitych w mikropędach po suplementacji prekursorami, wyrażana w ekwiwalentach rutozydu, była znacznie wyższa (1364,32 i 1324,14 mg RE/100 g) niż samego rutozydu (16,03 mg/100 g). Co wiadomo na temat innych flawonoidów ?

WNIOSEK KOŃCOWY

Rozprawę doktorską mgr Marty Klimek-Szczykutowicz oceniam bardzo wysoko i uważam, że zasługuje na wyróżnienie. Uważam, że mgr Marta Klimek-Szczykutowicz w pełni zasługuje na stopień doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Marty Klimek-Szczykutowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej
i Biotechnologii Roślin
J. Budzianowski
prof. dr hab. Jaromir Budzianowski

Poznań, 3 września 2021 r.

prof. dr hab. n. farm. Jaromir Budzianowski