

Prof. dr hab. Tomasz Jankowski
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

Poznań, 28 sierpnia 2018

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Łukasza Macieja Łopusiewicza
pt.: **“Charakterystyka wybranych melanin pochodzących z biomasy grzybowej i ich zastosowanie do poprawy właściwości użytkowych materiałów opakowaniowych”**,

(Recenzję wykonano na zlecenie Rady Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, stosownie do Uchwały z dnia 27 czerwca 2018 r.)

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Artura Bartkowiaka w Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych na Wydziale Nauki o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Na opiniowaną rozprawę składa się cykl 8 oryginalnych prac naukowych obejmujących w jednorodny sposób zagadnienie wykorzystania melanin pozyskiwanych z grzybów kapeluszowych do modyfikacji materiałów opakowaniowych w postaci folii. Publikacje ukazały się w latach 2017-2018 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (6 pozycji) oraz wydawnictwach krajowych (2 pozycje) w następującej kolejności:

1. Łopusiewicz Ł., Lisiecki S., Mizielińska M. 2017. Aktywność przeciwutleniająca folii PE i PLA modyfikowanych powłokami zawierającymi melaniny grzybowe. *Opakowanie*, 3:81-85.
2. Łopusiewicz Ł., Lisiecki S., Mizielińska M. 2017. Właściwości przeciwutleniające i optyczne folii BOPP i PET modyfikowanych powłokami zawierającymi melaniny grzybowe. *Opakowanie*, 7:48-55.
3. Łopusiewicz Ł. 2018. *Scleroderma citrinum* melanin: isolation, purification, spectroscopic studies with characterization of antioxidant, antibacterial and light barrier properties. *World Scientific News*, 94: 115-130.
4. Łopusiewicz Ł., Jędra F., Mizielińska M. 2018. New poly (lactic acid) active packaging composite films incorporated with fungal melanin. *Polymers*, 10(4): 386
5. Łopusiewicz Ł. 2018. The isolation, purification and analysis of the melanin pigment extracted from *Armillaria mellea* rhizomorphs. *World Scientific News*, 100: 135-153.
6. Łopusiewicz Ł., Jędra F., Bartkowiak A. 2018. New active packaging films made from gelatin modified with fungal melanin. *World Scientific News*, 101: 1-30.
7. Łopusiewicz Ł., Jędra F., Bartkowiak A. 2018. The application of melanin modified gelatin coatings for packaging and the oxidative stability of pork lard. *World Scientific News*, 101: 108-119.
8. Łopusiewicz Ł. 2018. Waste from the harvesting of button mushroom (*Agaricus bisporus*) as a source of natural melanin. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis. Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica*. (w druku).

We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, w czterech samodzielnych, a pozostałe są firmowane przez trzech współautorów. Z dołączonych oświadczeń wynika, że wkład mgr inż. Łopusiewicza w ich opracowanie był bardzo znaczący i zawierał się w przedziale 70 – 90%. Wartość punktowa cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe Doktoranta

wg klasyfikacji czasopism punktowanych MNiSzW wynosi **84**, przy czym jedna z prac jest ujęta w bazie JCR ze współczynnikiem **IF=3,364**.

Poza publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy Pana mgr inż. Łopusiewicza, zamieszczono w niej streszczenie w języku polskim i angielskim, dalej omówienie problematyki badań przedstawionych w załączonych publikacjach w formie 7 krótkich rozdziałów obejmujących uzasadnienie wyboru tematu, cel pracy i hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki badań, wnioski i spis cytowanej literatury, łącznie 18 stron. Ponadto, w rozprawie znalazły się dane na temat przebiegu rozwoju naukowego i wykaz dorobku Doktoranta.

Tytuł rozprawy jest sformułowany prawidłowo i dostatecznie jasny.

Ocena trafności celów rozprawy

Problematyka badawcza rozprawy doktorskiej mgr inż. Łukasza Łopusiewicza jest osadzona w ważnym sektorze branży produkcji żywności, mianowicie opakowalnictwie produktów spożywczych. Pakowanie produktów jest jedną z końcowych operacji w produkcji żywności, poprzedzających ich przechowywanie i spożycie i ma ogromne znaczenie dla zabezpieczenia żywności przed działaniem czynników środowiskowych na drodze od producenta do konsumenta. Pomijając funkcje marketingowe i informacyjne, opakowania powinny charakteryzować się odpowiednią barierowością wobec pary wodnej i tlenu, posiadać odpowiednie właściwości mechaniczne i cieplne, a także chronić produkt przed zmianami chemicznymi i działaniem mikroorganizmów. Dwie ostatnie, z wymienionych cech opakowań, są cechą opakowań aktywnych, gdzie przez modyfikację materiałów opakowaniowych nadaje się im odpowiednio ukierunkowaną funkcjonalność.

W ostatnich latach, duża liczba prac badawczych poruszających problematykę opakowań aktywnych dotyczyła wykorzystania w nich substancji pochodzenia naturalnego o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych. Wśród nich zidentyfikowano wiele substancji wykazujących aktywność przeciwutleniającą i przeciwdrobnoustrojową, m.in. karotenoidy, flawonoidy i inne związki fenolowe, kwasy organiczne, olejki eteryczne, ekstrakty przypraw, bakteriocyny oraz enzymy, które następnie, ze zmiennym powodzeniem, testowano w modelowych, aktywnych opakowaniach na różnych produktach żywnościowych. Wdrożenie wyników tych badań do praktyki, wymaga pogłębionej wiedzy o funkcjonalności tych substancji po wprowadzeniu do materiału opakowania, a ponadto zaawansowanych studiów o interakcjach aktywnych dodatków z matrycą opakowania w kontekście zmienności jej właściwości mechanicznych, cieplnych, optycznych i barierowych.

Wymienione problemy stanowią ogólny cel rozprawy mgr inż. Łopusiewicza, gdzie hipoteza badawcza zakłada, że melanina pozyskiwana z wybranych grzybów kapeluszowych może stanowić substancję o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych, wykorzystaną do modyfikacji folii opakowaniowych.

Szczegółowe cele rozprawy można ująć w następujących zagadnieniach:

- Opracowanie metody izolacji i oczyszczania melaniny z biomasy pieczarki dwuzarodnikowej, opieńki miodowej i tęgoskóra cytrynowego.
- Charakterystyka właściwości mechanicznych cieplnych barierowych, optycznych, przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych folii z poli(kwasu mlekowego) i żelatyny po modyfikacji melaniną grzybową.
- Ocena właściwości barierowych i przeciwutleniających folii z polietylenu, polipropylenu i poli(tereftalanuetylenu) zmodyfikowanych melaniną.

- Zbadanie właściwości przeciwutleniających folii żelatynowej z dodatkiem melaniny po opakowaniu smalcu wieprzowego.

Należy dodać, że właściwości przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe melanin różnego pochodzenia były już przedmiotem badań różnych autorów w kraju i na świecie, także w odniesieniu do materiałów opakowaniowych. Jednakże, jak dotąd, melanina pochodząca z grzybów kapeluszowych, w tym z masowo dostępnej pieczarki, nie została scharakteryzowana i wykorzystana do wytwarzania funkcjonalnych folii opakowaniowych.

Biorąc pod uwagę zarówno naukową, jak i praktyczną wartość zaplanowanych badań, należy podkreślić, że cel postawiony w rozprawie jest silnie osadzony w problematyce opracowania nowych, funkcjonalnych materiałów opakowań do żywności i poszerzy współczesną wiedzę o interakcjach zachodzących pomiędzy składnikami powłok o pożądanym cechach funkcjonalnych.

Merytoryczna ocena rozprawy

Publikacje składające się na rozprawę doktorską mgr inż. Łukasza Łopusiewicza ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych i zostały już wcześniej zaopiniowane w procesie wydawniczym przez specjalistów. Rola recenzenta rozprawy jest w takim przypadku ograniczona i sprowadza się do wykazania związku tematyki tych publikacji z celem rozprawy, a ponadto udziału Doktoranta w ich powstaniu.

Opublikowane prace mgr Łopusiewicza można podzielić na trzy grupy. Do pierwszej należy zaliczyć trzy publikacje autorstwa Doktoranta dotyczące pozyskiwania i charakterystyki melanin grzybowych pochodzących z odpadów pieczarki dwuzarodnikowej, ryzomorf opieńki miodowej i owocników tęgoskóra cytrynowego, oznaczone przez Autora symbolami P1, P2 i P3. Szczegółowo przedstawiono w nich metodykę ekstrakcji i oczyszczania melanin, a ponadto ich charakterystykę fizykochemiczną wykorzystując analizę spektroskopową w zakresie promieniowania UV-VIS, podczerwieni, spektroskopię Ramana i kolorymetrię. Oznaczono także właściwości przeciwutleniające ekstraktów, zawartość polifenoli oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowe na wzorcowych patogenach zagrażających żywności. Autor stwierdził, że wszystkie badane melaniny cechuje aktywność przeciwutleniająca (największa dla melaniny pochodzącej z opieńki miodowej) i aktywność przeciwbakteryjna. W kontekście aplikacyjnych celów badań, największą wartość ma publikacja „*Waste from the harvesting of button mushroom (*Agaricus bisporus*) as a source of natural melanin*”, zaś pozostałe dwie mają raczej charakter poznawczy.

Do drugiej grupy publikacji, składających się na rozprawę doktorską mgr inż. Łukasza Łopusiewicza, należą cztery opracowania firmowane, poza Doktorantem, przez dwóch innych autorów, które dotyczą wykorzystania melanin grzybowych do modyfikacji folii opakowaniowych. W dwóch publikacjach badaniom poddano folie z polietylenu, poli(kwasu mlekowego), polipropylenu i poli(tereftalanu etylenu), pokrywane powłoką sporządzoną z chitozanu lub modyfikowanej skrobi, zmieszanych z melaninami izolowanymi z trzech wymienionych wcześniej grzybów. Ponadto, w kolejnych dwóch opracowaniach, zbadano folię kompozytową z poli(kwasu mlekowego) oraz folię żelatynową z dodatkiem melaniny pieczarkowej. Metodyka badań jest podobna i skupia się przede wszystkim na oznaczaniu właściwości przeciwutleniających, barwie i barierowości folii, a w odniesieniu do kompozytów PLA i folii żelatynowej badania poszerzono o właściwości mechaniczne i przeciwdrobnoustrojowe. Wyniki badań przedstawione w wymienionych publikacjach wskazują na możliwość zarówno powlekania folii opakowaniowych preparatem melaniny, jak również wprowadzenia melanin w strukturę materiału tworzącego folię. Poza potwierdzeniem przeciwutleniających właściwości folii z dodatkiem melanin, nieznacznie

obniżonego w porównaniu do czystych ekstraktów tych substancji, szczegółowo przedstawiono tu zmiany właściwości fizykochemicznych folii, spowodowane dodatkiem melanin.

Do trzeciej grupy zaliczyć należy opracowanie pt. „*The application of melanin modified gelatin coatings for packaging and the oxidative stability of pork lard*”, w którym smalec wieprzowy powleczono folią żelatynową z dodatkiem melaniny wyizolowanej z pieczarki w celu sprawdzenia właściwości barierowych i przeciwutleniających modelowego opakowania. Wyniki badań wykazały istotne zmniejszenie się wyróżników procesu utleniania się tłuszczu (liczba ponadtlenkowa i kwasowa), co jednoznacznie przypisano działaniu melaniny zawartej w powłoce żelatynowej.

Podsumowując merytoryczną ocenę rozprawy należy stwierdzić, że opublikowane prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Łuksza Łopusiewicz są tematycznie jednorodne, dobrze zaplanowane i cechuje je profesjonalizm badawczy. Podkreślić należy bardzo dobry warsztat badawczy Doktoranta, umiejętność doboru i opanowania szeregu różnorodnych i specjalistycznych metod badawczych oraz weryfikacji uzyskanych wyników.

Ocena wartości naukowej i praktycznej rozprawy

W swojej rozprawie doktorskiej mgr inż. Łukasz Łopusiewicz w pełni rozwiązał postawione zadania badawcze i osiągnął założony cel pracy, planując oraz realizując doświadczenia w sposób zgodny z wymaganiami współczesnej nauki. Doktorant w sposób przejrzysty przedstawił problem badawczy rozprawy, wskazał na trendy rozwojowe w opakowalnictwie artykułów żywnościowych oraz potrzeby w tym zakresie, wynikające z zagrożeń środowiskowych, czym bardzo dobrze uzasadnił cel bieżących badań. Ponadto, Doktorant wykazał bardzo dobre opanowanie trudnych i zróżnicowanych metod badawczych, Jednocześnie, Wyniki swoich badań Doktorant przedstawił w ośmiu opublikowanych pracach naukowych, gdzie w sposób przejrzysty przedstawił kluczowe wyniki badań. Prace te mają dużą wartość poznawczą i ogromny potencjał aplikacyjny.

W opinii recenzenta, do najważniejszych naukowych i praktycznych osiągnięć ocenianej pracy należą:

Wykazanie, że melaniny pozyskiwane z wybranych grzybów kapeluszowych, jak pieczarka dwuzarodnikowa i tęgoskór cytrynowy oraz ryzomorf opieńki miodowej posiadają właściwości przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe.

Wykazanie, że odpady wytwarzane w przemysłowej produkcji pieczarki są bogatym źródłem melaniny, która po ekstrakcji i oczyszczeniu może być użyta do modyfikacji folii opakowaniowych w kierunku nadania im właściwości przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych i poprawy niektórych właściwości fizycznych folii.

Wytworzenie funkcjonalnego opakowania z folii żelatynowej z dodatkiem melaniny grzybowej do modelowego produktu spożywczego i wykazanie poprawy właściwości fizykochemicznych opakowania, w tym barierowości względem tlenu i promieniowania UV-VIS oraz cech przeciwutleniających, co w konsekwencji poprawiło trwałość produktu.

Ocena formy edytorskiej rozprawy

Rozprawa doktorska mgr inż. Łuksza Łopusiewicz jest przygotowana w postaci spójnego tematycznie zbioru opublikowanych prac naukowych, w których Doktorant jest samodzielnym lub głównym autorem. Publikacje są zaprezentowane w rozprawie w kolejności przedstawiającej postęp w realizacji badań dotyczących w pierwszej kolejności charakterystyki fizykochemicznej melanin grzybowych, dalej wykorzystania tych substancji do modyfikacji materiałów opakowaniowych w postaci folii w celu nadania im odpowiedniej funkcjonalności,

a w końcu sprawdzenia cech funkcjonalnych na modelowym produkcie spożywczym. Jakość edytorska opracowań już opublikowanych nie budzi zastrzeżeń. Tylko w jednej z nich, oznaczonej jako P2, „zagubiono” opis pierwszej kolumny w tabeli 3. należy także zwrócić uwagę Autorowi na sposób zapisu separatorów dziesiętnych w części wstępnej rozprawy napisanej w języku polskim, gdzie zamiast kropek powinno się stosować przecinki.

Szczegółowe uwagi dotyczące treści rozprawy i zagadnienia do dyskusji w czasie obrony

- We wstępie do rozprawy oraz w kilku wydanych publikacjach, w opisie metody pozyskiwania melanin z biomasy grzybowej, Autor podaje warunki wirowania w postaci liczby obrotów bębna wirówki. Zdaniem oceniającego nie jest to właściwe. Dla osoby chcącej wykorzystać metodykę podaną przez Autora dane są niewystarczające, gdyż warunki wirowania zależą nie tylko od liczby obrotów, ale także promienia bębna (typu wirówki). Poprawnie jest przedstawiać warunki wirowania w postaci wielokrotności liczby g ($\times g$).
- Proszę o wyjaśnienie, czym kierowano się przy wyborze stężenia melaniny dodawanej do powłok nakładanych na folie (publikacje P4 i P5), wprowadzanych do kompozytu PLL oraz do folii żelatynowej.
- Jak wyjaśnić fakt, że folie z polietylenu, polilaktydu, polipropylenu i poli(tereftalanuetylenu) modyfikowane melanią wykazywały podobną, a dla większości stężeń melaniny identyczną zawartość polifenoli i identyczne wielkości inhibicji rodnika DPPH (publikacje P4 i P5) ?
- Czy można porównać właściwości przeciwutleniające melanin grzybowych do typowych związków wykorzystywanych w przetwórstwie żywności (np. kwasu askorbinowego, butylohydroksyanizolu (BHA), czy butylohydroksytoluenu (BHT) ?
- W publikacji P5, w części wyniki i dyskusja, pisze się o powłokach z lakieru „Varnish”, podczas gdy w tabelach przedstawiających wyniki badań tego materiału nie ujęto.

Uwaga końcowa

Po szczegółowym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pana mgr inż. Łukasza Łopusiewicza pt. *“Charakterystyka wybranych melanin pochodzących z biomasy grzybowej i ich zastosowanie do poprawy właściwości użytkowych materiałów opakowaniowych”*, stwierdzam, że jest ona oryginalnym i znaczącym wkładem naukowym do działu wiedzy, której dotyczy. Pan mgr Łopusiewicz dowiódł w rozprawie, że jest doświadczonym badaczem dysponującym dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnościami praktycznymi w zakresie technologii żywności, szczególnie opakowalnictwie żywności. Cel postawiony w pracy doktorskiej został osiągnięty, a jej wyniki wniosły do nauki elementy poznawcze i praktyczne.

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu Pana mgr inż. Łukasza Łopusiewicza w powstaniu publikacji, z których składa się Jego rozprawa uważam, że spełnia ona wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595, wraz z późniejszymi zmianami). Proszę Wysoką Radę Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pana mgr inż. Łukasza Łopusiewicza do publicznej obrony. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową rozprawy i dorobek naukowy Doktoranta, wnioskuję do Wysokiej Rady w oddzielnym piśmie o przyznanie mgr inż. Łukaszowi Łopusiewiczowi stosownego wyróżnienia.

T. Paulow