



dr hab. inż. Alicja Kucharska, prof. nadzw

Wrocław, 26.04.2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Łukasza Woźniaka pt. „Wykorzystanie nadkrytycznego tlenu węgla (IV) do ekstrakcji wybranych grup metabolitów wtórnych z wycieków owocowych” wykonanej w Zakładzie Analizy Żywności Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod kierunkiem dr hab. inż. Renaty Jędrzejczak, prof. IBPRS

Rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Woźniaka ma formę spójnego tematycznie cyklu 5 oryginalnych prac naukowych. Autor zebrał cykl publikacji w postaci raportu, w którym kopie publikacji (rozdział 9) poprzedza zwięzłe omówienie (rozdziały od 1 do 8). Omówienie to składa się z wykazu publikacji, streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu, przeglądu piśmiennictwa, prezentacji celu i zakresu pracy, opisu materiału i metodyki badań, omówieniu i dyskusji wyników, podsumowania i wniosków oraz spisu piśmiennictwa. Jak wspomniano, rozdział 9. stanowi kopie artykułów. W rozdziale 10 przedstawiono oświadczenia współautorów publikacji stanowiących cykl oryginalnych prac naukowych, na podstawie których przygotowana jest praca doktorska mgr inż. Łukasza Woźniaka. Część zasadnicza omówienia zawiera zwięzły opis przeprowadzonych badań (skróty publikacji) przedstawiony w prawidłowym układzie pracy naukowej. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w latach 2015-2018 w recenzowanych czasopismach (Separation Science and Technology (publikacja nr 1 – P1), Applied Sciences (P2), Molecules (P3 i P4), Chromatographia (P4)) o łącznej liczbie punktów MNiSW 130 i sumarycznym wskaźniku Impact Factor równym 9,759. Zgodnie z deklaracją Doktoranta i oświadczeniami współautorów (rozdział 10), udział Doktoranta w publikacjach wynosił od 70% do 80%. We wszystkich pięciu publikacjach Doktorant jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Oznacza to, że praca naukowa Doktoranta została już wysoko oceniona przez niezależnych specjalistów recenzujących artykuły naukowe w czasopismach z listy JCR. Stanowi to gwarancję merytorycznej poprawności przyjętego modelu badawczego i sformułowanych wniosków.

Przedstawiona do recenzji praca badawcza dotyczy oceny i optymalizacji ekstrakcji związków fenolowych i terpenowych z wycieków owoców kolorowych i jabłkowych tlenkiem węgla (IV) w stanie nadkrytycznym. Podjęcie takiego tematu oceniam wysoko, zarówno z punktu widzenia wyboru metody ekstrakcji, materiału badawczego, jak i analizowanych związków aktywnych. Ekstrakcja płynem nadkrytycznym (SFE) w ostatnich latach wzbudza coraz większe zainteresowanie wśród naukowców jako alternatywna metoda separacji związków aktywnych z materiałów roślinnych. Niewiele jest jednak prac dotyczących ekstrakcji związków z wycieków owocowych, które pomimo że są odpadem poprodukcyjnym, stanowią bogate źródło związków bioaktywnych, dlatego podjęcie tej tematyki przez Doktoranta uważam za celowe, ważne z punktu widzenia nauki, ale także i praktyki.

2019 · 08



Dokonany przez Doktoranta przegląd literatury, zawarty we wstępie opracowania oraz w artykułach, potwierdza Jego szeroką wiedzę teoretyczną z zakresu ekstrakcji prowadzonej w warunkach nadkrytycznych, jak i z zakresu związków aktywnych z grupy polifenoli i terpenów zawartych w surowcach roślinnych.

Celem badań Doktoranta była weryfikacja hipotezy badawczej zakładającej, że ekstrakcja w warunkach nadkrytycznych tlenkiem węgla (IV) wybranych metabolitów wtórnych z wycieków owocowych może stanowić alternatywę dla ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Weryfikacji tej hipotezy Doktorant dokonał w oparciu o przeprowadzenie badań w zakresie ekstrakcji związków fenolowych z wycieków owoców wiśni i aronii (pierwsza część pracy, na którą składają się dwie publikacje) oraz w zakresie ekstrakcji związków terpenowych z wycieków jabłkowych (druga część pracy, na którą składają się trzy publikacje, w tym jedna przeglądowa). Szczegółowe cele badań zawarte w artykułach były sformułowane jednoznacznie i przejrzysto.

Doktorant właściwie opisał materiał badawczy, który w przypadku wycieków z wiśni i aronii pozyskał samodzielnie w warunkach laboratoryjnych, natomiast w przypadku wycieków jabłkowych otrzymał od lokalnego producenta soków. Mam jednak zastrzeżenie do informacji dotyczącej zawartości suchej masy w otrzymanych wyciekach wiśniowych, która jak podają Autorzy w publikacji P1, wynosiła $24,2 \pm 0,2\%$. Prawdopodobnie wkraśl tu błąd, który nie został zauważony przez Autorów i recenzentów czasopisma, gdyż sucha masa świeżych owoców, w zależności od odmiany i roku, może wynosić od 10% do 28%. Doktorant szczegółowo przedstawił ekstrakcję tlenkiem węgla (IV) w warunkach nadkrytycznych oraz rozpuszczalnikami organicznymi. Do oznaczeń zawartości antocyjanów i triterpenowych Doktorant wykorzystał metody chromatograficzne (odpowiednio HPLC i GC), natomiast do oznaczenia związków polifenolowych ogółem i do określenia aktywności przeciwutleniającej ekstraktów polifenolowych – metody spektrofotometryczne, które to metody zostały wyczerpująco opisane. Dodatkowo, Doktorant oznaczył ilościowo m.in. kwas ursolowy według nowej procedury analitycznej, której opis zawarł w publikacji P4 stanowiącej przedmiot rozprawy doktorskiej. Procedura oznaczania kwasów triterpenowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorometrycznym (HPLC-FDL) obejmuje szczegółowy opis ekstrakcji, hydrolizy alkalicznej, ekstrakcji do fazy stałej i upochodniania. Wartość publikacji podnosi przeprowadzona walidacja nowej procedury analitycznej.

Drobną rozbieżność, wynikającą zapewne z pomyłki, dostrzegłam w podanych eluentach wykorzystanych do rozdzielania antocyjanów, gdyż w części metodycznej publikacji (P1 i P2) podano acetonitryl, natomiast w omówieniu (podrozdział 5.5.2.) – metanol. Pewną nieścisłością jest podawanie w opisie metody chromatograficznej (podrozdział 5.5.2.), że „Zawartość antocyjanów oznaczono spektrofotometrycznie przy długości fali 520 nm”. Chciałam zaznaczyć, że podobnego zdania nie ma w opisie metody oznaczania zawartości antocyjanów metodą HPLC w ocenianych publikacjach Doktoranta.

W rozdziale *Omówienie i dyskusja wyników* opracowania stanowiącego odzwierciedlenie informacji zawartych w trzech publikacjach, stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej (P1, P2 i P5), Doktorant przedstawił wyniki dotyczące optymalizacji parametrów ekstrakcji tlenkiem węgla (IV) w warunkach



nadkrytycznych wybranych związków aktywnych z wyłoków wiśniowych (P1), aroniowych (P2) i jabłkowych (P5). W procesie ekstrakcji Doktorant dobrał optymalną temperaturę i ciśnienie procesu. Wykazał, że zarówno w przypadku wyłoków wiśniowych, jak i aroniowych najwyższą wydajność ekstrakcji związków fenolowych uzyskuje się prowadząc proces w temperaturze 35 °C, przy ciśnieniu 10 MPa i z 80% dodatkiem etanolu. W przypadku natomiast wyłoków jabłkowych najszybszą ekstrakcję związków terpenowych uzyskuje się przy temperaturze 80 °C i ciśnieniu 30 MPa. Doktorant wykazał najwyższą rozpuszczalność kwasu ursolowego i β -sitosterolu właśnie przy tych parametrach.

Dużym osiągnięciem, o znaczeniu aplikacyjnym, jest niewątpliwie próba powiększenia skali procesu ekstrakcji związków triterpenowych z wyłoków jabłkowych, do czego Doktorant zastosował matematyczne opisy kinetyki procesu. Modelowanie kinetyki ekstrakcji mgr inż. Łukasz Woźniak zawarł w publikacji P5. Autor podkreślił, że wybór odpowiedniego modelu matematycznego umożliwia prognozowanie przebiegu krzywych ekstrakcji co, w przypadku powiększenia skali procesu, ma istotne znaczenie w punkcie widzenia ekonomii produkcji.

Przedstawione przez Autora wyniki wskazują, że wyłoki z owoców, takich jak wiśnie czy aronia stanowią doskonałe źródło związków fenolowych o wysokich właściwościach przeciwnadkrytycznych. Podobnie, dobrym źródłem biologicznie aktywnych związków terpenowych są wyłoki jabłkowe. W tych ostatnich Autor zidentyfikował osiemnaście triterpenów, wśród których dominującym związkiem był kwas ursolowy o udowodnionym szerokim spektrum właściwości farmakologicznych. Przeglądu 204 artykułów dotyczących tego związku mgr inż. Ł. Woźniak dokonał w publikacji P3 stanowiącej przedmiot rozprawy doktorskiej, w której wkład Doktoranta w jej powstanie wynosił 80%. Analiza tak obszernego materiału piśmiennictwa świadczy o doskonałym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta. O wysokim poziomie tej publikacji świadczą również cytowania, których przez okres ok. 4 lat ukazało się, wg bazy Web of Science, aż 57 (na dzień 7 stycznia 2019 r.)! W publikacji tej przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat prozdrowotnych właściwości kwasu ursolowego, a także informacje o jego występowaniu i biosyntezie. Wśród wielu właściwości tego związku szczególne ważne znaczenie mają właściwości przeciwrakowe, przeciwzapalne i przeciwbakteryjne, co wyraźnie zostało podkreślone w publikacji przeglądowej Doktoranta.

Niewątpliwie dużym sukcesem naukowym jest także opracowanie nowej procedury analitycznej służącej do ilościowego oznaczania kwasów triterpenowych, w tym kwasu ursolowego. Opis tej metody Doktorant zawarł w publikacji P4, która stanowi przedmiot rozprawy doktorskiej oraz w rozdziale 5.5.1. opracowania, o czym już wcześniej wspomniałam przy ocenie części metodycznej pracy.

Analiza wyników zamieszczonych w niniejszym rozdziale oraz lektura publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej dowodzi, że zamierzony cel recenzowanej pracy został osiągnięty.

W rozdziale 7. opracowania, Doktorant przedstawił w punktach podsumowanie i wnioski związane z celem i zakresem pracy oraz znajdujące uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych badań opisanych w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. W mojej ocenie nie wszystkie punkty w tym rozdziale są jednoznacznie sformułowane. W punkcie drugim, Doktorant napisał: „Przebadane wyłoki owocowe okazały się być bogatym źródłem związków o charakterze bioaktywnym. Zawartość



badanych związków w wyciekach była kilkakrotnie wyższa od wartości przedstawionych w piśmiennictwie dla świeżych owoców. Wynika to z faktu, że w skład wycieków wchodzi przede wszystkim skórki i pestki, które są zwykle najbogatsze w metabolity wtórne”. Chciałam jednak zauważyć, że zgodnie z opisem pozyskania przez Doktoranta wycieków (publikacja P1), do tłoczenia wykorzystano owoce wiśni bez pestek, a przytoczone wyjaśnienie, choć ogólne, dotyczy jak wynika z przytoczonego opisu Doktoranta „przebadanych wycieków owocowych”.

Literatura, na którą powołuje się Doktorant w opracowaniu i w publikacjach świadczy o dobrym przeglądzie stanu wiedzy jakiego dokonał Doktorant przygotowując się do pracy naukowej. Spis piśmiennictwa w opracowaniu jest starannie przygotowany. Większość cytowanych publikacji pochodzi z ostatnich lat.

Jakość edytorska opracowania oraz publikacji nie budzi zastrzeżeń.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zadać Doktorantowi następujące pytania:

- 1) Jaka była sucha masa mrożonych wycieków z owoców kolorowych, a jaka wysuszonych wycieków jabłkowych?
- 2) Na jaką masę wycieków, świeżych czy suchych, były przeliczane wartości w publikacjach P1, P2, P5?
- 3) Jaki jest średni udział procentowy pestek w wyciekach wiśniowych?
- 4) W jakie metabolity wtórne bogate są pestki wiśni i pestki innych owoców?

Omówienie oraz zamieszczone publikacje dowodzą, że Doktorant ma szeroką wiedzę z nauk rolniczych i potrafi samodzielnie rozwiązać problem naukowy oraz analizować, interpretować i opracować otrzymane wyniki. Badania Doktoranta mają nie tylko aspekt poznawczy, ale także aplikacyjny. Dlatego stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Woźniaka, pt. „Wykorzystanie nadkrytycznego tlenu węgla (IV) do ekstrakcji wybranych grup metabolitów wtórnych z wycieków owocowych” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym, wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Łukasza Woźniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Alicja Kucharska