

Lublin, 15.04.2019

dr hab. Michał Świeca prof. uczelni  
Katedra Biochemii i Chemii Żywności  
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Łukasz Woźniak

pt. „Wykorzystanie nadkrytycznego tlenu węgla (IV) do ekstrakcji wybranych grup  
metabolitów wtórnych z wyłoków owocowych”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Renaty Jędrzejczak, prof. IBPRS

i promotora pomocniczego dr inż. Sylwii Skąpskiej

Podstawa prawna: Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz  
stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65 poz.595 z późn. zm.)

Podstawą opinii jest pismo prof. dr hab. Mirosława Słowińskiego Dziekana Wydziału Nauk  
o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 26-02-2019

### **Informacje ogólne - uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej**

Według danych GUS, wartość produkcji soków z owoców i warzyw oraz soków zagęszczonych w Polsce utrzymuje ok. 3 proc. wzrost rynku rocznie. Jednym z głównych produktów odpadowych w tej gałęzi przetwórstwa są wyłoki, które z uwagi na dużą masę i objętość stanowią ważny problem dla przedsiębiorstw. Dotychczas surowe wyłoki były zwykle wykorzystywane jako pasza dla zwierząt, substrat w produkcji biopaliw lub jako nawóz w rolnictwie. Należy jednak podkreślić, że w zależności od surowca, z którego pochodzą oraz technologii produkcji soków mogą one stanowić

bogate źródło wartościowych składników odżywczych i funkcjonalnych (np. węglowodanów, związków mineralnych, błonnika, polifenoli). Stąd też, w ostatnich latach, prowadzone są liczne badania podstawowe i aplikacyjne mające na celu opracowanie nowych technologii pozwalających na efektywną utylizację tej frakcji odpadowej. Badania te m.in. koncentrują się na izolowaniu frakcji o udokumentowanej bioaktywności, które mogą następnie wchodzić w skład preparatów nutraceutycznych, dodatków funkcjonalnych do żywności czy też posłużyć do bezpośredniej fortyfikacji produktów spożywczych. Tradycyjne metody izolowania związków z klasy polifenoli lub terpenoidów z materiału roślinnego obejmują zwykle koszt- i czasochłonne ekstrakcje z użyciem rozpuszczalników organicznych. Potencjalne zastosowanie odzyskanych w ten sposób związków bioaktywnych w przemyśle spożywczym wiąże się z potrzebą usunięcia z układu rozpuszczalnika. Alternatywę w tym przypadku stanowi zastosowanie ekstrakcji z wykorzystaniem rozpuszczalników w stanie nadkrytycznym. W trend ten bardzo dobrze wpisują się badania prowadzone przez Pana mgr inż. Łukasza Woźniaka obejmujące aplikację tlenku węgla (IV) do ekstrakcji wybranych grup metabolitów z wyłoków owocowych. Co istotne badania te obejmują surowce odpadowe, które polski przemysł spożywczy generuje w dużej ilości, zaś grupy metabolitów, które wydajnie można odzyskać wykazują duży potencjał prozdrowotny. Z uwagi na powyższe tematyka podjęta w dysertacji doktorskiej Pana mgr inż. Łukasza Woźniaka jest niezwykle istotna, a uzyskane wyniki wnoszą znaczący wkład do nowoczesnej technologii żywności.

### **Ocena formalna pracy**

Podstawę rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Łukasza Woźniaka pt. „Wykorzystanie nadkrytycznego tlenku węgla (IV) do ekstrakcji wybranych grup metabolitów wtórnych z wyłoków owocowych” stanowi zbiór 5 prac opublikowanych w latach 2015-2018 w czasopismach indeksowanych w Journal Citation Reports:

1. Woźniak, Ł., Marszałek, K., Skąpska, S. (2016). Extraction of phenolic compounds from sour cherry pomace with supercritical carbon dioxide: Impact of process parameters on the composition and antioxidant properties of extracts. *Separation Science and Technology*, 51(9), 1472–1479.
2. Woźniak, Ł., Marszałek, K., Skąpska, S., & Jędrzejczak, R. (2017). The application of supercritical carbon dioxide and ethanol for the extraction of phenolic compounds from chokeberry pomace. *Applied Sciences*, 7(322), 1–12.
3. Woźniak, Ł., Skąpska, S., & Marszałek, K. (2015). Ursolic acid—a pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20, 20614–20641.

4. Woźniak, Ł., Marszałek, K., Skąpska, S., & Jędrzejczak, R. (2017). Novel method for HPLC analysis of triterpenic acids using 9-anthryldiazomethane derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia*, 80, 1527–1533.

5. Woźniak, Ł., Szakiel, A., Pączkowski, C., Marszałek, K., Skąpska, S., Kowalska, H., & Jędrzejczak, S. (2018). Extraction of triterpenic acids and phytosterols from apple pomace with supercritical carbon dioxide: impact of process parameters, modelling of kinetics, and scaling-up study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23, 2790.

Całkowita punktacja publikacji wchodzących w skład dysertacji wynosi 130 punktów wg wykazu oceny czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, zaś sumaryczny IF (*impact factor*) – 9,759. Ranga czasopism, w których prace zostały opublikowane, nie pozostawia wątpliwości co do wysokiego poziomu naukowego i warsztatowego Kandydata. Wszystkie publikacje wchodzące w skład dysertacji są pracami wieloautorskimi, w których Pan mgr inż. Woźniak jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Udział Kandyda w ich powstawaniu (zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów znajdującymi się na stronach 129-144) jest kluczowy i wynosi 70%-80%. Pewne zdziwienie budzi rola Promotorki dysertacji doktorskiej, która ograniczała się tylko do nadzorowania prac związanych z przygotowaniem artykułów, zaś zgodnie z opisem nie miała Ona bezpośredniego wpływu na ogólną koncepcję badań oraz ich realizację.

Opracowanie, w którym umieszczono pełne wersje publikacji obejmuje 153 strony i zostało podzielone na 2 główne części: Praca doktorska oraz Dorobek naukowy. Dysertacja rozpoczyna się streszczeniem w języku polskim i angielskim, po którym przedstawiony jest szczegółowy spis treści. W tematykę wprowadza Wstęp oraz Przegląd piśmiennictwa (strony 13-22). W kolejnych rozdziałach Doktorant jasno formułuje cel główny i cele szczegółowe pracy (strona 26), przedstawia metodologię badań (strony 27-34) oraz główne wyniki pracy doktorskiej. Tę część dysertacji kończy Podsumowanie i wnioski oraz Spis piśmiennictwa. W drugiej części opracowania przedstawiony został dotychczasowy dorobek Doktoranta, który obejmuje 24 publikacje naukowe i 10 doniesień konferencyjnych. Sumaryczny dorobek Pana mgr inż. Łukasza Woźniaka kształtuje się następująco: IF= 50,31, punktacja wg MNiSW= 670, liczba cytowań wg Web of Science= 149, Index Hirscha= 7 i potwierdza, iż jest On osobą o już znaczących osiągnięciach naukowych. Na podkreślenie zasługuje również Jego udział w licznych projektach badawczych, w tym kierownictwo w projekcie Preludium finansowanym przez NCN.

### **Ocena merytoryczna pracy**

W przeglądzie literatury Autor omawia główne aspekty związane z wykorzystaniem odpadów pochodzących z przemysłu owocowo-warzywnego. Uwagę swą skupia głównie na wytlókach z jabłek, dokonując charakterystyki ich składu. W mojej opinii w pierwszym podrozdziale brak jest informacji o innych surowcach (np. winogrona, pomidory, owoce cytrusowe), które od lat znajdują się w kręgu

zainteresowań technologów żywności z uwagi na wysoką zawartość substancji funkcjonalnych. Obszerna część opracowania poświęcona jest również metabolitom wtórnym, w której skupiono się na związkach fenylopropanoidowych oraz terpenoidowych. Pragnę zwrócić uwagę, że zaproponowany podział związków polifenolowych jest jednym z licznych, a zakwalifikowanie tanin jako oddzielnej grupy może być kontrowersyjne, gdyż faktycznie są to pochodne kwasów fenolowych. Pewien niedosyt budzi dość pobieżne potraktowanie bioaktywności wyżej wymienionych grup idiolitów, które zostało ograniczone do aktywności przeciwutleniającej. Byłbym wdzięczny, gdyby Kwalifikant mógł odnieść się do tego zagadnienia i szerzej przedstawić potencjalne prozdrowotne działanie fenylopropanoidów. W ostatniej części przeglądu literatury zostały scharakteryzowane płyny nadkrytyczne oraz aplikacje w przemyśle spożywczym ze szczególnym uwzględnieniem ekstrakcji tkanek roślinnych. W oparciu o opis można wnioskować, że wiedza Kandydata dotycząca technik bazujących na ekstrakcji z użyciem rozpuszczalników w stanie nadkrytycznym jest wysoka i kompleksowa.

W pracy brak jasno zdefiniowanej hipotezy badawczej (pośrednio można o niej wnioskować na podstawie przedstawionego celu). Co prawda Kandydat przedstawia zakres realizowanych prac, jednak w mojej ocenie wiele z podjętych działań nie służy bezpośrednio do weryfikacji problemu badawczego, a raczej opisuje harmonogram prac w projekcie.

Część metodyczna pracy szczegółowo wprowadza w zagadnienia związane z ekstrakcją nadkrytycznym tlenkiem węgla (IV) oraz analitykę kwasów triterpenoidowych. W tej części dysertacji na uwagę zasługuje krytyczna walidacja nowo opracowanej metody oznaczania kwasu ursolowego bazującej na derywatywacji z 9-antryldiazometnem i detekcją fluorescencyjną oraz jej porównanie z dotychczas stosowaną metodą bazująca na technice HPLC z detekcją UV.

Omówienie wyników kompiluje główne wyniki dysertacji, wskazując na najważniejsze osiągnięcia. Co istotne wyniki zostały skonfrontowane z danymi literaturowymi z zakresu tematu. W rozdziale Podsumowania i wnioski Autork systematyzuje uzyskane obserwacje oraz stara się przedstawić wnioski końcowe.

Jak już nadmieniono we wcześniejszej części recenzji, podstawę rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Łukasza Woźniaka stanowi zbiór 5 spójnych tematycznie opracowań opisujących zagadnienia związane z ekstrahowaniem związków polifenolowych i terpenoidowych z wyłoków owocowych oraz oceną ich potencjalnej bioaktywności. Dwa pierwsze z opracowań zostały opublikowane w czasopiśmie *Separation Science and Technology* (IF=1,106) oraz *Applied Sciences* (IF= 1,689) dotyczyły optymalizacji warunków ekstrakcji związków polifenolowych odpowiednio z wyłoków wiśniowych i aroniowych. Wykazano, że zarówno dla wyłoków wiśniowych i aroniowych optymalne warunki ekstrakcji związków polifenolowych są tożsame (temperatura 35°C, ciśnienie 10 MPa, 80% dodatek etanolu). Co istotne, dokonano również porównania z „klasycznymi” metodami izolowania polifenoli bazującymi na zastosowaniu rozpuszczalników organicznych. Trzy kolejne opracowania dotyczą związków terpenoidowych. Pierwsze z nich stanowi praca przeglądowa (*Molecules*,

IF=2,465), która krytycznie systematyzuje dotychczasową wiedzę dotyczącą kwasu ursulowego, ze szczególnym uwzględnieniem jego potencjalnej bioaktywności. Kolejne z opracowań (Chromatographia, IF=1,401) to praca metodyczna opisująca nową metodę oceny warunków ekstrakcji i oznaczania zawartości kwasów triterpenoidowych. Wykazano, że nowoopracowana metoda wykazuje wysoką powtarzalność, jest niemal stukrotnie czulsza od obecnie stosowanych i co niezwykle istotne zaproponowany sposób tworzenia pochodnych jest prosty i szybki. Ostatnia z prac została opublikowana w czasopiśmie *Molecules* (IF= 3,098). Wykazano, że dominującymi związkami trepenoidowymi w wyciekach jabłkowych są kwas ursolowy, kwas oleanolowy, beta-sitosterol oraz kwas pomolowy. Wartościowym zagadaniem pozwalającym na lepsze zrozumienie procesu ekstrakcji stanowią wyniki opisujące kinetykę procesu otrzymane dla różnych parametrów temperatury, ciśnienia i szybkości przepływu tlenu węgla (IV). W mojej ocenie niezwykle istotna i wartościowa jest także podjęta próba powiększenia skali procesu przeprowadzona dla wcześniej zoptymalizowanych warunków ekstrakcji.

W rozdziale tym wyjaśnienia lub korekty wymagają następujące sformułowania:

-Str. 16, 33, 37. Zwrot „zmiatanie” wydaje się być nieodpowiednim dla opracowania naukowego. Sugeruje zastąpić go słowem „neutralizacja”.

-Na stronie 33 Autor przedstawia metody użyte do oceny potencjału przeciwutleniającego jednak w niektórych przypadkach dołącza błędne odniesienia literaturowe. Zaproponowane metody są od lat stosowane i nawet w przypadku modyfikacji powinno zostać przedstawione odniesienie do metody źródłowej.

-Str. 35. Autor wyraża zawartość związków bioaktywnych w odniesieniu do 100 g wycieków. Prosiłbym o uszczegółowienie czy mamy do czynienia z suchą masą, a jeśli tak to jak została ona wyznaczona.

W badaniach zoptymalizowano warunki ekstrakcji z użyciem cieczy w stanie nadkrytycznym i konfrontowano uzyskane wyniki z klasyczną ekstrakcją z użyciem rozpuszczalników organicznych. Czy Kwalifikant mógłby przybliżyć warunki prowadzenia tego procesu oraz wskazać jakie było kryterium ich wyboru.

W swoich badaniach mgr inż. Łukasz Woźniak dowiódł, że ekstrakcja z użyciem dwutlenku węgla (IV) w stanie nadkrytycznym pozwala na efektywną izolację substancji o potencjale bioaktywnym z wycieków. Co istotne, Autor w swoim dziele wykazał, że optymalne warunki prowadzenia są odmienne dla różnych surowców, wyznaczając jednocześnie wariant optymalny z punktu widzenia wydajności procesu. W odniesieniu do powyższego stwierdzam, że Kwalifikant umiejętnie połączył ze sobą zagadnienia z zakresu technologii żywności i chemii analitycznej, a przedstawiona do oceny dysertacja obejmuje wyniki wartościowe pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Jednocześnie pragnę podkreślić, że wszystkie uwagi przedstawione w ocenie pracy mają charakter redakcyjny, część z nich dyskusyjny i nie mają one wpływu na pozytywną ocenę merytoryczną pracy.

## **Wniosek końcowy**

Przedstawiona do recenzji dysertacja mgr inż. Łukasza Woźniaka pt. „Wykorzystanie nadkrytycznego tlenu węgla (IV) do ekstrakcji wybranych grup metabolitów wtórnych z wyłoków owocowych ” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady o dopuszczanie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Tematyka badawcza doktoratu przedstawionego do oceny stanowi wycinek światowych badań nad pozyskiwaniem substancji bioaktywnych z produktów odpadowych przemysłu spożywczego. Potwierdzeniem wyróżniającego się warsztatu badawczego zaprezentowanego w pracy doktorskiej jest lista pięciu publikacji wydanych w czasopismach JCR o współczynniku oddziaływania (IF= 9,759, MNiSzW= 130 pkt), w których Doktorant jest pierwszym autorem. Jako recenzent, który wnikliwie zapoznał się z treścią pracy doktorskiej, z pełną odpowiedzialnością mogę stwierdzić, że zakres rozprawy wyraźnie przewyższa przeciętne wymagania stawiane pracom doktorskim w zakresie nauk o żywności. W związku z powyższym wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o przyznanie wyróżnienia przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej pana mgr inż. Łukasz Woźniaka pt. „Wykorzystanie nadkrytycznego tlenu węgla (IV) do ekstrakcji wybranych grup metabolitów wtórnych z wyłoków owocowych”.



dr hab. Michał Świeca prof. uczelni