



**Samodzielna Pracownia
Chemii Produktów Pochodzenia Naturalnego
Katedra i Zakład Farmakognozji
UNIwersytet Medyczny w Lublinie**

ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN
tel./fax +48 81448 7080 e-mail: kskalicka@pharmacognosy.org

Lublin, 30.08.2021

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora mgr Anety Krakowskiej-Sieprawskiej zatytułowanej „**Techniki nadkrytyczne w pozyskiwaniu oraz oznaczaniu związków o właściwościach antyoksydacyjnych**”. Praca wykonana została w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem Prof. zw. dra hab., dra h. c. Bogusława Buszewskiego oraz promotor pomocniczej dr hab. Katarzyny Rafińskiej.

Ekstrakcja jest pierwszym i najbardziej kluczowym etapem przygotowania materiału do dalszej pracy. Dobrze dobrana technika ekstrakcji, jak i opracowane optymalne jej warunki zapewniają efektywny odzysk analitu oraz brak konieczności dalszego oczyszczania interesujących związków ze złożonej matrycy. Jedną z technik nabierającą w ostatnich latach coraz większego znaczenia jest ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym. Niewątpliwie jej zaletami jest możliwość przyspieszenia procesu, jego kontrola na każdym etapie jak i wysoka selektywność. Zastosowanie ditlenku węgla jest doskonałą alternatywą dla technik klasycznych, gwarantującą nie tylko wyzbycie się rozpuszczalników organicznych ale także możliwość zastosowania procesu w skali przemysłowej.

Za nadrzędny cel pracy Doktorantka postawiła sobie opracowanie nowych, kompleksowych protokołów ekstrakcji polifenoli z ziela lucerny siewnej, łubinu żółtego oraz ostrokrzewu paragwajskiego z zastosowaniem CO₂ w stanie nadkrytycznym. Aby proces ekstrakcji był jeszcze bardziej efektywny Doktorantka zastosowała dedykowane enzymy, które mają zdolność degradacji ściany komórkowej roślin, a co za tym idzie ułatwiają uwalnianie związków bioaktywnych. Ekstrakcja wspomagana enzymatycznie jest procesem biologicznym, dającym w efekcie produkt w 100% naturalny. Warunkiem kluczowym jest dobór odpowiednich enzymów, które umożliwią wyodrębnienie pożądanego składnika. Ponadto, ich aktywność jest ściśle uzależniona od temperatury i pH środowiska.

W skład recenzowanej pracy doktorskiej wchodzi siedem prac – cztery publikacje wydrukowane w specjalistycznych czasopismach z listy JCR, dwa artykuły o charakterze przeglądowym oraz zgłoszenie patentowe. Sumaryczny IF (ISI Journal Citation Reports) cyklu jest równy **11.602**, zaś punktacja MNiSW wynosi **505**. Są to następujące pozycje:

- Aneta Krakowska, Bogusław Buszewski. Substancje biologicznie aktywne izolowane i oznaczane w materiale roślinnym, *Analityka* nr 4, 2016, 4-11, MNiSW: 5

- Magdalena Ligor, Aneta Krakowska-Sieprawska, Anna Kielbasa, Hossam Al-Suod, Bogusław Buszewski, Wybrane rośliny lecznicze jako źródło związków biologicznie aktywnych roz. 20 [w] *Bioanalityka w nauce i życiu. 1: Nowe wyzwania w bioanalizie klinicznej i ocenie naturalnych surowców leczniczych*/red. nauk. I. Baranowska, B. Buszewski, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2020, 301-318, MNiSW: 20

- Aneta Krakowska, Katarzyna Rafińska, Justyna Walczak, Tomasz Kowalkowski, Bogusław Buszewski. Comparison of various extraction techniques of *Medicago sativa*: yield, antioxidant activity and content of phytochemical constituents, *Journal of AOAC International*, 2017, 100, 6, 1681-1693, IF: 1.087, MNiSW: 40

- Aneta Krakowska, Katarzyna Rafińska, Justyna Walczak, Bogusław Buszewski. Enzyme-assisted optimized supercritical fluid extraction to improve *Medicago sativa* polyphenolics isolation, *Industrial Crops and Products*, 2018, 124, 931-940, IF: 4.191, MNiSW: 200

- Aneta Krakowska-Sieprawska, Katarzyna Rafińska, Justyna Walczak-Skierska, Bogusław Buszewski. The influence of plant material enzymatic hydrolysis and extraction conditions on the polyphenolic profiles and antioxidant activity of extracts: a green and efficient approach, *Molecules*, 2020, 25, 2074, 1-17, IF: 3.267, MNiSW: 100

- Aneta Krakowska-Sieprawska, Katarzyna Rafińska, Justyna Walczak-Skierska, Anna Kielbasa, Bogusław Buszewski. Promising green technology in obtaining functional plant preparations: combined enzyme-assisted supercritical fluid extraction of flavonoids isolation from *Medicago sativa* leaves, *Materials (Basel)*, 2021, 14, 2724, 1-17, IF: 3.057, MNiSW: 140

- Katarzyna Rafińska, Aneta Krakowska-Sieprawska, Justyna Walczak-Skierska, Bogusław Buszewski. Sposób otrzymywania związków polifenolowych oraz flawonoidów z roślin i nasion (P.432585), 2020

Praca doktorska ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań. We wstępie Doktorantka wprowadza nas w podjętą tematykę badań, krótko charakteryzuje polifenole, prezentuje zwięźle technikę ekstrakcji nadkrytycznej czy ekstrakcji wspomaganą enzymatycznie oraz wyjaśnia dlaczego trzy rośliny – lucerna siewna, łubin żółty oraz ostrokrzew paragwajski wybrane zostały jako rośliny modelowe do dalszych badań. W rozdziale „Problem badawczy”

Doktorantka pogłębia nakreślone wcześniej zagadnienia, krótko charakteryzuje problemy i cele badawcze oraz prezentuje też wyniki otrzymane w toku prowadzonych badań. O ile wszystko to stanowi spójną całość to jednak dziwi kolejny rozdział „Cele i założenia dysertacji”, które niejako powinny znaleźć się przed opisem otrzymanych wyników. Niemniej jednak cel pracy sformułowany jest jasno i prawidłowo. Przedstawione też zostały kolejne etapy jego realizacji.

W dalszej części na 4 stronach Doktorantka opisuje krótko metodologię prowadzonych badań. Całość poparta jest bibliografią liczącą 49 pozycji. Piśmiennictwo jest dobrane odpowiednio, w przeważającej części są to pozycje pochodzące z ostatnich lat. Jest to głównie literatura fachowa, anglojęzyczna, publikowana w znanych, liczących się czasopismach.

Pracę zwieńcza rozdział „Podsumowanie i wnioski” oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Dołączone są także oświadczenia współautorów. Doktorantka przedstawiła także krótko swój dorobek naukowy, co pozwala zapoznać się z Jej sylwetką młodego, ale bardzo już doświadczonego badacza. Dla porządku dodam jedynie, iż wygodnie byłoby gdyby Doktorantka ze spisu publikacji wyłączyła te prezentowane na początku, a wchodzące w cykl ocenianej pracy doktorskiej.

Praca poprzedzona jest dwustronicowym wykazem skrótów i oznaczeń. Rozprawa przygotowana jest starannie, napisana jest precyzyjnym, przystępnym językiem. Wszystko razem stanowi spójną całość.

Po przeanalizowaniu dołączonych publikacji oraz przeczytaniu opracowania stwierdzam, iż mgr Aneta Krakowska-Sieprawska zrealizowała postawione przed sobą ambitne cele. W toku prowadzonych badań uzyskała niezwykle interesujące wyniki i wyciągnęła wnioski inspirujące do ich kontynuowania.

Doktorantka opracowała procedurę optymalizacji parametrów ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym wskazując jednoznacznie na parametry kluczowe, mające największy wpływ na skuteczność i efektywność procesu. Aby zmniejszyć liczbę eksperymentów i zidentyfikować skutki interakcji między zmiennymi eksperymentalnymi Autorka wykorzystała analizę metodologii powierzchni odpowiedzi (RSM), co pozwoliło na wytypowanie najefektywniejszych wartości dla parametrów takich jak temperatura, ciśnienie, ilość dodawanego współrozpuszczalnika.

Zwrócić uwagę należy na bardzo interesujące i w pewien sposób nowatorskie podejście do tematu ekstrakcji polifenoli z materiału roślinnego, a mianowicie zastosowanie enzymów degradujących ścianę komórkową roślin. Doktorantka użyła powszechnie stosowany w przemyśle rolniczym wieloenzymatyczny preparat przeznaczony do poprawy strawności paszy dla trzody chlewnej – Kemzyme, co znacznie podniosło efektywność wcześniej zoptymalizowanego procesu ekstrakcji polifenoli. W przypadku ekstraktów z łubinu żółtego i ostrokrzewu paragwajskiego zawartość związków fenolowych była ponad trzykrotnie wyższa niż dla analogicznie przygotowanych ekstraktów nadkrytycznych na materiale, który nie był

poddany wcześniejszemu działaniu enzymów. Wiedząc jak istotny jest dobór odpowiednich warunków reakcji enzymatycznej pod kątem np. zakresu pH czy temperatury Autorka skupiła się na opracowaniu praktycznego i kompleksowego protokołu ekstrakcji z zastosowaniem wybranego preparatu złożonego – wspomnianego już Kemzymu. Jako materiał modelowy wybrała lucernę siewną i ponownie wykorzystwała metodologię powierzchni odpowiedzi (RSM). Doktorantka stosując skaningową mikroskopię elektronową (SEM) zaobserwowała istotne zmiany w strukturze materiału roślinnego, co prawdopodobnie przełożyło się na poprawę dystrybucji CO₂ i zwiększyło ilość wyizolowanych związków. W tym miejscu chciałam zadać istotne pytanie. Czy Doktorantka porównała surowe chromatogramy ekstraktu otrzymanego z materiału roślinnego przed i po przeprowadzeniu hydrolizy i czy zaobserwowano istotne zmiany. Czy mogło zdarzyć się tak, że pojawiły się nowe piki związków będące efektem degradacji? Czy oznaczane ilościowo związki mogły uwolnić się z innych istniejących połączeń, co przełoży się na wzrost ich zawartości, ale tym samym na obniżenie lub całkowity brak innych struktur macierzystych?

W tym miejscu należy podkreślić, iż na sposób otrzymywania związków polifenolowych z materiału roślinnego z zastosowaniem mieszaniny 2 preparatów enzymatycznych złożono zgłoszenie patentowe, którego Doktorantka jest drugim autorem.

Pani mgr Aneta Krakowska-Sieprawska w badaniach stosowała także metody oceny aktywności biologicznej - i tak na przykład oznaczono całkowitą zdolność przeciwutleniającą ekstraktów z liści lucerny za pomocą metody z rodnikiem DPPH oraz poprzez zdolność do redukcji jonów srebra i tworzenie nanocząstek. Po przeanalizowaniu otrzymanych wyników Autorka stwierdza, iż właściwości antyoksydacyjne ekstraktów są istotnie skorelowane z zawartością kwasów fenolowych i flawonoidów a najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym charakteryzowały się ekstrakty szczególnie bogate w kwasy fenolowe. Nadmienić należy, iż jest to rzecz oczywista i nie budzi zdziwienia. Można byłoby pójść krok dalej i na podstawie kolejnych eksperymentów wskazać konkretne związki wykazujące najwyższą badaną aktywność. Dla ekstraktów z lucerny Doktorantka przeprowadziła też badania cytotoksyczności oraz zaproponowała możliwy mechanizm działania. Z kolei dla ekstraktów z ostrokrzewu paragwajskiego oraz łubinu żółtego określony został profil działania przeciwbakteryjnego.

W toku prowadzonych przez siebie badań Doktorantka wykorzystwała szereg technik separacyjnych oraz instrumentalnych takich jak np. ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami, ciśnieniem i temperaturą, ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym (samodzielnie czy też wspomagana enzymami), wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas, spektroskopia UV/ViS, skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa. Celem optymalizacji metod wykorzystwała dodatkowo narzędzia matematyczno-statystyczne. Świadczy to o wszechstronności i samodzielności Doktorantki, oraz o obyciu i doświadczeniu w pracy laboratoryjnej.

W pracach wchodzących w skład recenzowanego cyklu Doktorantka jest wiodącym wykonawcą. Każdorazowo brała udział we współpracowaniu koncepcji i planu pracy, zaangażowana była w każdy z etapów eksperymentów, samodzielnie wykonała większość badań a w pozostałe badania była włączona. Każdorazowo jest autorem wstępnych wersji ocenianych prac.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego PRELUDIUM 15 o nr 2018/29/N/ST4/01180 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz projektu PLANTARUM o nr BIOSTRATEG2/298205/9/NCBR/2016 ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. W tym miejscu podkreślić należy, zdolności Doktorantki do pozyskiwania finansowania na prowadzone badania, co świadczy po pierwsze o bardzo dobrym doborze tematyki badawczej, która jest aktualna i przyszłościowa, ale także o wysokiej pozycji mgr Anety Krakowskiej-Sieprawskiej jako młodego naukowca.

Poszczególne publikacje przeszły już proces recenzji przed ich przyjęciem do druku. Po lekturze rozprawy, jak i analizie wspomnianych prac nasuwa się kilka komentarzy lub/i pytań.

- strona 32 – zamieniłabym niefortunne tutaj określenie „podstawowa struktura flawonoidów” na aglikon

- Doktorantka kilkakrotnie używa jednocześnie sformułowania „polifenole i flawonoidy”. Flawonoidy zaliczane są do grupy polifenoli. Można pozostawić same „polifenole” lub zamienić na „polifenole, w tym flawonoidy”

- w pacy D3 czy D6 Doktorantka oznacza sumę flawonoidów. Stosowana jest metodyka zaczerpnięta z literatury wraz z modyfikacjami. Upewnić chciałam się, czy Doktorantka wykonała hydrolizę przed oznaczeniem z chlorkiem glinu (III). W omawianym oznaczeniu wykorzystuje się zdolność reagowania form aglikonowych (zwłaszcza flawonoli) z solami (jonami) niektórych metali, w tym glinu. W wyniku tej reakcji, na skutek utworzenia jednego lub kilku zamkniętych pierścieni między jonami metalu a atomami grup podstawnikowych (fenolowych lub ketonowych) powstają barwne, rozpuszczalne kompleksy. Pytanie to jest o tyle zasadne, iż we wstępie wspomnianej pracy Autorka nadmienia, iż w ekstraktach z lucerny dotychczas zidentyfikowano szereg glikozydów flawonoidowych.

Podsumowując stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte oryginalne wyniki mają charakter poznawczy i stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny. Przedstawiony do oceny cykl prac jest spójny, badania własne Doktorantka zaplanowała dobrze i konsekwentnie zrealizowała. Wysoką wartość wykonanych badań obrazują artykuły opublikowane w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. W tym miejscu chciałabym jeszcze raz wyróżnić aplikacyjny charakter pracy.

Wnioski końcowe

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Anety Krakowskiej-Sieprawskiej spełnia wymogi formalne i merytoryczne określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii UMK w Toruniu o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr Anety Krakowskiej-Sieprawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość uzyskanych, wyników wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Samodzielna Pracownia Chemii
Produktów Pochodzenia Naturalnego
Katedra i Zakład Farmakognozji
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 1
20-093 Lublin
tel./fax: 81 448 7080

Prof. dr hab. Krystyna Skalicka-Woźniak

Krystyna Skalicka-Woźniak
KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni Chemii
Produktów Pochodzenia Naturalnego
Katedry i Zakładu Farmakognozji
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. Krystyna Skalicka-Woźniak