

Prof. dr hab. inż. Tadeusz Trziszka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

Pracy doktorskiej pt.: „Techniki nadkrytyczne w pozyskiwaniu oraz oznaczaniu związków o właściwościach antyoksydacyjnych”

Autor mgr Aneta Krakowska-Sieprawska

Promotor: Prof. zw. dr hab. *dr h.c. multi* Bogusław Buszewski, czł. koresp. PAN

Promotor pomocniczy: dr hab. Katarzyna Rafińska, prof. UMK

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wydział Chemii, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky

1. Wartość podjętej tematyki w świetle aktualnych trendów

W ostatniej dekadzie produkty naturalnego pochodzenia, w tym surowce pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i biotechnologicznego znajdują coraz większe znaczenie w profilaktyce oraz terapii wielu schorzeń uznanych jako choroby cywilizacyjne, a także jako uzupełnienie leczenia metodami tradycyjnymi. Również ze strony społeczeństwa obserwujemy coraz większe zainteresowania produktami pochodzenia naturalnego w odniesieniu do suplementów diety, nutraceutyków, czy preparatów biomedycznych, a także żywności funkcjonalnej, zawierającej zwiększoną koncentrację biologicznie aktywnych składników, głównie ekstraktów pochodzenia roślinnego.

Ziołolecznictwo, znane też jako fitoterapia, ma bardzo odległą historię sięgającą początków ludzkości i czasów pierwotnych, zanim jeszcze pojawiła się pierwsza cywilizacja. W przeszłości ziołolecznictwo stanowiło podstawową metodę leczenia polegającą na wykorzystaniu surowców i przetworów roślinnych do wywoływania korzystnych zmian w funkcjonowaniu organizmu.

„Złota era leku roślinnego” trwała do lat trzydziestych XX wieku, kiedy to w 1935 roku Gerhard Domagk (laureat Nagrody Nobla w 1939 roku) otrzymał na drodze syntezy chemicznej sulfonamidy. W ciągu ostatnich 100 lat masowa produkcja leków syntetycznych zmieniła opiekę zdrowotną w większości krajów świata i rozpoczęła się era leków syntetycznych.

Obecnie, mimo bardzo wysokiego zaawansowania badań nad innowacyjnymi lekami i technologiami ich syntezy, zainteresowanie naturalnymi preparatami nie maleje, a wręcz odwrotnie – obserwujemy powrót do ziołolecznictwa i ponowne docenianie zadziwiającej mocy roślin leczniczych. Należy podkreślić, że prowadzone są w dalszym ciągu na całym świecie intensywne badania nad surowcami roślinnymi. Poszukuje się nowych biologicznie aktywnych substancji w roślinach, szczegółowo bada się ich skład, mechanizm działania związków czynnych i opracowuje metody ich wyodrębniania.

Tym wszystkim działaniom towarzyszy wielka nadzieja ludzi na znalezienie skutecznych leków do walki z nieuleczalnymi dotąd chorobami. O wartości leków ziołowych świadczy fakt o ich wysokim udziale w ogólnej puli preparatów stosowanych na świecie i w Polsce, a według danych Światowej Organizacji Zdrowia, wynosi 20–25%. Pod względem wielkości sprzedaży produktów ziołowych Polska jest trzecim rynkiem Europy, po Niemczech i Francji. Zioła, jak i ich preparaty stosuje się zarówno jako terapie podstawowe, głównie w leczeniu chorób przewlekłych, jak i podczas terapii wspomagającej w połączeniu z naturalnymi biosubstancjami. W tym zakresie

Duży wkład wniósł projekt pt.: „**Rośliny uprawne oraz produkty naturalne jako źródła substancji biologicznie aktywnych przeznaczonych do produkcji preparatów kosmetycznych, farmaceutycznych i suplementów diety**” **PLANTARUM**, kierowany przez prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, wybitnego naukowca w obszarze analityki medycznej, farmaceutycznej, żywności i środowiska. Dzięki współpracy w przedmiotowym projekcie ośrodków naukowych z renomowanymi producentami kosmetyków i wyrobów medycznych, mających szerokie doświadczenie na rynku polskim i zagranicą, opracowano preparaty, wzbogacone o aktywne cyklitole, flawonoidy i saponiny. Preparaty ziołowe doskonale wpisują się w proces terapii a także służą w okresie rekonwalescencji po ciężkich chorobach, zabiegach operacyjnych oraz przebytej chemioterapii i radioterapii. Skuteczne i bezpieczne stosowanie ziół i preparatów ziołowych wymaga jednak posiadania określonego zasobu wiedzy o ich działaniu, przyrządzaniu i sposobie dawkowania.

W ostatnim okresie publikowanych jest setki prac naukowych i popularno-naukowych, w których jako wybitna postać pojawia się dr Henryk Różański, autor m.in.: „**Przewodnika Fitoterapeuty**”, który jest opracowaniem o wysokim potencjale edukacyjnym przydatnym dla osób zajmujących się ziołolecznictwem, jak i amatorów zgłębiających wiedzę o anatomii, fizjologii i elementach biochemii w aspekcie zrozumienia wpływu produktów zielarskich na zdrowie człowieka.

Najczęstszą metodą pozyskiwania preparatów zielarskich jest ekstrakcja. W tradycyjnym zielarstwie wykorzystywano głównie formy ekstrakcji wodnej (odwar, napar, macerat) bądź alkoholowej (nalewka), obecnie coraz częściej stosuje się innowacyjne metody ekstrakcji, takie jak: ekstrakcja nadkrytyczna, ekstrakcja z wykorzystaniem mikrofal, czy też ekstrakcja z zastosowaniem oddziaływania pola ultradźwiękowego.

W Polsce istnieją długoletnie tradycje produkcji zielarskiej, jednak w skali przemysłowej stosuje się głównie ekstrakcję rozpuszczalnikową i destylację z parą wodną. Wady tych metod, takie jak: niska wydajność, obecność resztek toksycznych rozpuszczalników w ekstrakcie, czy też powstawanie niepożądanych związków pod wpływem długotrwałej ekspozycji na wysokie temperatury, spowodowały poszukiwanie alternatywnych sposobów ekstrakcji. Jednym z najprostszych sposobów intensyfikacji ekstrakcji, było wykorzystanie zamiast wody, rozpuszczalników organicznych i ich mieszanin. Wspomaganie oddziaływaniem fal ultradźwiękowych skutkuje poprawą efektywności procesu, w porównaniu z wzorcową ekstrakcją z wykorzystaniem aparatu Soxhleta. Jak się okazało przy zastosowaniu oddziaływań mikrofalowych, a także pola ultradźwiękowego, sumaryczne zużycie energii jest niższe niż w przypadku ekstrakcji „na gorąco”, a ponadto zwiększa się stężenie tych substancji w ekstrakcie i pojawiają się nowe bioskładniki. Świadczy to o wysokiej przydatności stosowania innowacji w procesach ekstrakcyjnych.

Obecnie, w skali przemysłowej, wysoce innowacyjną ekstrakcją jest ekstrakcja w stanie nadkrytycznym. Płyny w stanie nadkrytycznym zaobserwowano i udokumentowano po raz pierwszy już w XIX w. Natomiast zastosowanie w skali przemysłowej obserwuje się od ok. 30 lat, co wskazuje na występowanie istotnych przeszkód technicznych. Pogłębiona znajomość, zwłaszcza procesów wymiany ciepła i masy w układach z płynami nadkrytycznymi, jest jeszcze krótsza i wynosi około 15 lat. Wiele problemów pozostaje ciągle jeszcze otwartych i stanowi przedmiot intensywnych badań. Dotyczy to np. badania i opisu matematycznego zjawisk wymiany energii oraz masy zachodzących w obszarze punktu krytycznego. Ponadto zachodzące zjawiska towarzyszące ekstrakcji w układzie ciało stałe-płyn nadkrytyczny posiadają w istocie charakter stochastyczny, często o przebiegu niestacjonarnym. Dlatego też konieczne jest użycie odpowiedniego obliczenia matematycznego do opisu tych zjawisk oraz zweryfikowanie dotychczasowego podejścia o charakterze deterministycznym. Do pozyskiwania ekstraktów z materiałów roślinnych coraz szerzej stosowana jest ekstrakcja płynem nadkrytycznym (SFE) z użyciem ditlenku węgla. Ditlenek węgla jest gazem całkowicie niepalnym i nietoksycznym i jest chętnie wykorzystywany do ekstrakcji cennych związków roślinnych, a także z surowców pochodzenia zwierzęcego. Istnieje łatwość kontrolowania jego zdolności do rozpuszczania różnych substancji poprzez zmianę parametrów procesu. Możliwości tej nie posiadają tradycyjne metody ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe. Ditlenek węgla nie rozpuszcza niektórych

związków, jak np.: fenoli, alkaloidów czy glikozydów ze względu na ich polarny charakter. Niewielki dodatek rozpuszczalników organicznych, np. metanolu, etanolu, acetonu, acetonitrylu, eteru etylowego, dichlorometanu lub wody pozwala na zwiększenie wydajności procesu ekstrakcji właśnie związków polarnych.

Zagadnieniom tym poświęcona jest oceniana rozprawa doktorska p. mgr Anety Krakowskiej-Sieprawskiej, szczególnie w odniesieniu do pozyskiwania bioaktywnych substancji z polskich roślin uprawnych za pomocą nowoczesnych narzędzi i metod analitycznych w celu zastosowań np. w preparatach żywnościowych, kosmetycznych i biomedycznych. Dlatego podjęte badania należy uznać za niezwykle istotne, zwłaszcza w perspektywie budowy Narodowego Programu Żywności i Zdrowia. Stąd, podjęte badania wnoszą kolejny poziom innowacji w obszarze ekstrakcji nadkrytycznej jeszcze dotąd nierozpowszechnionej, uwzględniającej hydrolizę enzymatyczną zwiększającą skuteczność i wydajność ekstrakcyjną. Badania są innowatorskie i zasługują na szczególną uwagę zarówno od strony naukowej jak i technologiczno-wdrożeniowej.

2. Charakterystyka pracy, założenia i realizacja badań

Przedmiot badań ujętych w tytule i celu pracy uwzględniał opracowanie metodyki wyodrębnienia substancji biologicznie aktywnych z wybranych surowców roślinnych, charakteryzujących się wysoką zawartością związków o właściwościach antyoksydacyjnych, w szczególności związków polifenolowych. Treść przedkładanej pracy została ujęta na 167 stronach, w tym w 10 rozdziałach z uwzględnieniem dokumentacji, w tym tabele, ryciny i wykresy, streszczenie oraz formalne dokumenty. Przedkładana dysertacja jest podsumowaniem wcześniej opublikowanych sześciu oryginalnych prac naukowych, co jest swego rodzaju ewenementem w pracach doktorskich, bowiem głównie prace habilitacyjne opierają się o wcześniejsze publikacje recenzowane.

Z drugiej strony dla recenzenta jest to swego rodzaju ułatwienie, gdyż może skorzystać z wyników prac wcześniej ocenionych przez wybitnych specjalistów-recenzentów.

W zestawieniu bibliograficznym dysertacji Autorka wykorzystała 49 pozycji literaturowych nie wliczając już wcześniej opublikowanych artykułów i powoływania się na inne opracowania, co w sumie daje 222 pozycji literaturowych. Łącznie zestawienie publikacji ujętych w dysertacji wraz z pozostałymi publikacjami daje 271 pozycji, co świadczy o doskonałym przygotowaniu literaturowym i merytorycznym Autorki.

W części wstępnej pracy Doktorantka przedstawia ramy całego opracowania dysertacji i w skrótowym ujęciu przedstawia sześć już wyżej wspomnianych opublikowanych artykułów o sumarycznej wartości IF 11,6 i 505 punktów ministerialnych.

W rozdziale pierwszym Autorka na 13 stronach ujęła krótki wstęp wprowadzający do zagadnienia i przedstawiła techniki stosowane w ekstrakcji roślinnych związków biologicznie aktywnych.

W rozdziale drugim przedstawiono cel i założenia badań i jego uzasadnienie.

Rozdział trzeci ujmuję metodologię badań oraz skrócony opis metod ekstrakcji materiału roślinnego. Autorka poświęciła tu wiele uwagi takim zagadnieniom jak: opis metod ekstrakcji materiału roślinnego, procesy hydrolizy enzymatycznej materiału roślinnego, oznaczanie substancji biologicznie aktywnych o charakterze antyoksydacyjnym z uwzględnieniem analizy spektrofotometrycznej i analizy chromatograficznej.

Rozdział czwarty dotyczy prezentacji bibliografii, co jest uzupełnieniem w odniesieniu do wcześniejszych publikacji.

W rozdziale piątym Autorka prezentuje sześć już opublikowanych prac w czasopismach naukowych oraz patent (7):

1. **A. Krakowska, B. Buszewski**, *Substancje biologicznie aktywne izolowane i oznaczane w materiale roślinnym*, Analityka nr 4, 2016, 4-11, **MNiSW: 5**
2. M. Ligor, **A. Krakowska-Sieprawska**, A. Kielbasa, H. Al-Suod, B. 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

lecniczych/red. nauk. I. Baranowska, B. Buszewski, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2020, 301-318, **MNiSW: 20**

3. **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**
4. **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**
5. **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**
6. **Aneta Krakowska-Sieprawska**, Katarzyna Rafińska, Justyna Walczak-Skierska, Anna Kiełbasa, 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**
7. Katarzyna Rafińska, **Aneta Krakowska-Sieprawska**, Justyna Walczak-Skierska, Bogusław Buszewski, *Sposób otrzymywania związków polifenolowych oraz flawonoidów z roślin i nasion* (P.432585), 2020.

Rozdział szósty dotyczy podsumowania i wniosków.

Autorka wskazuje na opracowanie nowej, efektywnej metody pozyskiwania substancji bioaktywnych pochodzenia roślinnego o wysokim stężeniu związków o charakterze antyoksydacyjnym z wykorzystaniem ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym wspomaganą enzymami. Opracowano procedurę optymalizacji procesu ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym (SFE) (temperaturę, ciśnienie i dodatek współ-rozpuszczalnika) oraz kluczowych czynników, mających znaczący wpływ na stopień hydrolizy, tj. pH, stężenie enzymu, temperaturę i czas reakcji pozwalające na osiągnięcie najwyższej zawartości polifenoli i flawonoidów za pomocą metody powierzchni odpowiedzi. Spektroskopowe badania UV-Vis otrzymanych ekstraktów pozwoliły na analizę całkowitej zawartości polifenoli oraz flawonoidów. Badania chromatograficzne z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrem mas (HPLC/MS-MS) wykazały, że w przypadku ekstraktów z liści lucerny siewnej otrzymanych z materiału uprzednio poddanego hydrolizie enzymatycznej w optymalnych warunkach sumaryczna zawartość związków fenolowych była ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu z kontrolą. Ponadto, pozyskane ekstrakty zbadano pod kątem aktywności antyoksydacyjnej oraz biologicznej, mianowicie sprawdzono cytotoksyczność i zdolność ekstraktu (otrzymanego metodą kombinowanej enzymatycznej ekstrakcji płynem nadkrytycznym) do kontrolowania poziomu stresu oksydacyjnego w żywych komórkach.

Sformułowano ogólnie następujące wnioski:

1. Wykazano, iż skuteczność ekstrakcji związków polifenolowych zależała od czasu ekstrakcji, rodzaju rozpuszczalnika i współ-rozpuszczalnika oraz metody ekstrakcji;
2. Wykazano, iż ilość dodawanego polarnego współ-rozpuszczalnika do scCO₂ jest kluczowym parametrem w procesie ekstrakcji flawonoidów z liści lucerny siewnej;
3. Poprawa wydajności ekstrakcji polifenoli oraz flawonoidów poprzez zastosowanie enzymów degradujących ścianę komórkową roślin zakończyła się powodzeniem;
4. Wykazano, że wstępna obróbka materiału roślinnego preparatem enzymatycznym powszechnie stosowanym w przemyśle rolno-spożywczym znacznie podnosi efektywność wcześniej zoptymalizowanego procesu ekstrakcji substancji bioaktywnych.
5. Badanie wpływu zarówno parametrów ekstrakcji procesu SFE, jak i warunków hydrolizy enzymatycznej na izolację związków bioaktywnych za pomocą RSM wykazało, że podejście

to pozwala na znaczne zwiększenie całkowitej zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów w otrzymywanych ekstraktach przy jednoczesnej poprawie ich aktywności przeciwutleniającej.

6. Wykazano, iż najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym charakteryzowały się szczególnie bogate w kwasy fenolowe ekstrakty uzyskane przez ekstrakcję płynem nadkrytycznym w stanie nadkrytycznym wspomaganej enzymami.
7. Na podstawie ustalonej aktywności przeciwutleniającej, cytotoksyczności i zdolności ekstraktu otrzymanego metodą kombinowanej enzymatycznej ekstrakcji płynem nadkrytycznym do kontroli stresu oksydacyjnego w żywych komórkach zaproponowano mechanizm działania przeciwutleniającego flawonoidów *Medicago sativa* L.
8. Badania nad minimalnym stężeniem hamującym badanych ekstraktów z yerba mate i łubinu żółtego wykazały, iż skutecznie hamowały wzrost testowanych 9 szczepów bakteryjnych.

Zastosowana metodologia pozwoliła znacznie zwiększyć ilość izolowanych związków biologicznie aktywnych z materiału roślinnego, zwiększając wydajność, zwłaszcza w odniesieniu do związków polifenolowych oraz flawonoidów w materiale roślinnym. Opracowana metoda ekstrakcji może być zastosowana dla każdego rodzaju materiału roślinnego. Fakt ten ma uzasadnienie ekonomiczne i technologiczne, jako innowacja. Można stwierdzić, że zaprezentowana metoda ekstrakcji może być szybko wdrożona w przemyśle żywnościowym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Finalną częścią dysertacji są rozdziały 7-10.

W rozdziale siódmym ujęto streszczenie pracy ze szczególnym uwzględnieniem odzyskiwania związków bioaktywnych, możliwości zastosowania różnych metod ekstrakcji. Szczególną uwagę zwrócono na dobór rozpuszczalnika ekstrakcji z dodatkiem polarnego współ-rozpuszczalnika i parametrów procesu. Niezwykle ważnym jest wykorzystanie dedykowanych enzymów, które mają zdolność degradacji komórki roślinnej, a co za tym idzie ułatwiają uwalnianie związków bioaktywnych. Badania koncentrowały się na opracowaniu sposobu pozyskiwania substancji nieodżywczych pochodzenia roślinnego o wysokim stężeniu związków o charakterze antyoksydacyjnym, co było możliwe dzięki ekstrakcji ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym wspomaganej enzymami.

Rozdział 8 ujemuje abstrakt w j. angielskim, który ujemuje polski tekst i jest częścią tekstu z rozdziału 7.

W rozdziale 9 Autorka przedstawia swój dorobek naukowy (łącznie 59 pozycji). W rozdziale 10 przedstawiono oświadczenia współautorów wspólnych opracowań naukowych, co jest ogólnie przyjętą zasadą w systemie akademickim.

3. Ocena merytoryczna pracy

Praca doktorska Pani mgr **Anety Krakowskiej-Sieprawskiej** ujemuje zagadnienie ekstrakcji nadkrytycznej surowca roślinnego, który został przed procesem poddany hydrolizie enzymatycznej powodującej częściowy rozkład błon komórkowych materiału roślinnego, co w założeniach badawczych miało służyć zwiększeniu wydajności procesu i pozyskaniu większej objętości materiału zawierającego bioaktywne substancje (polifenole i flawonoidy). Dzięki temu procesowi izolowane związki były łatwiej uwalniane. W celu optymalizacji warunków hydrolizy enzymatycznej oraz ekstrakcji wykorzystano statystyczną metodologię powierzchni odpowiedzi. Charakterystyka pozyskanych ekstraktów obejmowała zastosowanie technik spektrofotometrycznych oraz chromatograficznych, mianowicie wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-MS/MS), co gwarantuje najwyższą wiarygodność prezentowanych wyników.

Podjęta tematyka badawcza stanowi interesujący, a także ważny obszar eksperymentalny, o dużym ciężarze gatunkowym i istotnym znaczeniu, zwłaszcza w odniesieniu do istniejącej wiedzy. Jak wyżej zaznaczono od dziesięcioleci modyfikuje się procesy ekstrakcji nadkrytycznej wprowadzając różne niekonwencjonalne metody wspierające proces, jednak połączenie technik ekstrakcji ditlenkiem węgla z wcześniejszym procesem biotechnologicznym z użyciem enzymów

jest nowym rozwiązaniem w technologiach ekstrakcji. Szkoda, że Autorka dla porównania nie odniosła się w dysertacji do opisu przemysłowej technologii ekstrakcji nadkrytycznej stosowanej od lat Instytucie Nawozów Sztucznych w Puławach w produkcji ekstraktów chmielowych.

Dobrze byłoby, gdyby Doktorantka w swojej dysertacji przedstawiła schemat procesu technologicznego, co byłoby bardziej przejrzyste i uzasadnione metodycznie.

Generalnie w ocenie recenzenta praca została wykonana bardzo solidnie z dużym zaangażowaniem czasowym i wysokim potencjałem merytorycznym, zwłaszcza, że na pełną treść pracy składa się siedem opracowań recenzowanych, w tym jedno zgłoszenie patentowe, które jest ukoronowaniem dzieła w aspekcie technologicznym.

Cel pracy przedstawiony na stronach 27 – 29 jest zbyt mocno opisowy i ujęty w dziewięciu punktach, co rozprasza uwagę czytelnika. W odniesieniu do tytułu pracy, zdaniem recenzenta cel mógłby się zamknąć w stwierdzeniu: „*Optymalizacja procesu separacji roślinnych biologicznie aktywnych substancji z uwzględnieniem ekstrakcji w płynie nadkrytycznym (dیتlenek węgla) oraz z zastosowaniem hydrolizy enzymatycznej*”. W uszczegółowieniu celu można dalej włączyć ww. 9 podpunktów.

Typowym miejscem w dysertacjach, gdzie recenzent może rozwinąć swoje uwagi jest metodyka i omówienie wyników oraz dyskusja. W tej pracy recenzent został pozbawiony tego przywileju, gdyż trudno jest dyskutować z pracami już recenzowanymi, których poziom jest bardzo wysoki. Nie jest to uwaga krytyczna. Jest to bardzo dobry pomysł na prezentację dojrzałej pracy doktorskiej, gdzie doktorant może zaprezentować swoją kreatywność i umiejętność wiązania różnych obszarów badawczych pozwalających na wyciągnięcie obiektywnych wniosków, których nie można byłoby ująć w takiej skali w jednym opracowaniu.

Wysoki poziom przedmiotowej pracy doktorskiej, zwłaszcza metodologia i bardzo ciekawe wyniki badań, wywołały dużą ciekawość recenzenta w następujących obszarach, co będzie przedmiotem publicznej obrony:

1. Jak wyjaśnić rolę przeciwutleniaczy i z tym związane ogromne zainteresowanie przemysłów żywnościowego, farmaceutycznego, kosmetycznego, paszowego, a także szeregowych obywateli?
2. Co było podstawą doboru roślinnego materiału badawczego, przypadkowość, czy precyzyjny dobór?
3. Jak można opisać metodę RSM z wykorzystaniem modelu Box – Behnken ?
4. Jak wyjaśnić fakt, że przy ekstrakcji metodami tradycyjnymi uzyskujemy niższą zawartość związków polifenolowych w porównaniu do ekstrakcji w płynach nadkrytycznych.
5. Procesy ekstrakcji prowadzono w mikro skali. Czy nie będzie przeszkód w przeskalowaniu do warunków półtechniki i przemysłowych?

4. Uwagi końcowe

Treść pracy doktorskiej „TECHNIKI NADKRYTYCZNE W POZYSKIWIANIU ORAZ OZNACZANIU ZWIĄZKÓW O WŁAŚCIWOŚCIACH ANTYOKSYDACYJNYCH” Pani mgr Anety Krakowskiej-Sieprawskiej ujęta w zwartym opracowaniu i sześciu odrębnych publikacjach oraz w zgłoszeniu patentowym stanowi bardzo ciekawe opracowanie zarówno pod względem naukowym jak i wdrożeniowym. Przedstawiona ocena merytoryczna ujęta w punkcie 3, w tym uwagi krytyczne nie umniejszają wysokiej wartości pracy zarówno poznawczej jak i praktycznej.

Podsumowując stwierdzam, że praca spełnia wszystkie kryteria stawiane dysertacji doktorskiej określone w dokumentach prawnych o stopniach naukowych i tytule naukowym. W związku z powyższym uprzejmie proszę Radę Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Anety Krakowskiej-Sieprawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uwzględniając całokształt, tj. wybór tematu, szeroką wiedzę Doktorantki, w tym znajomość najnowszej literatury, dobór materiału, biegłość analityczną i wspaniałą warsztat laboratoryjny, a przez to najwyższy poziom

gwarantowanych wyników oraz możliwości ich wykorzystania w praktyce, a także w innych opracowaniach metodycznych i przeglądowych wysoko oceniam przedmiotową dysertację. Powyższe uzasadnienie upoważnia recenzenta do stwierdzenia oryginalność pracy i jej wysokiej wartości zarówno naukowej jak i praktycznej. Jednocześnie wnoszę o szczególne wyróżnienie pracy, w tym nagrodą.



Wrocław, 31.08.2017 r.

prof. dr hab. inż. Tadeusz Trziszka