



Politechnika
Wrocławska

Prof. dr hab. inż. Katarzyna Chojnacka

Katedra Zaawansowanych Technologii Materiałowych

Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

ul. Smoluchowskiego 25, 50-372 Wrocław

tel. +4871-3204325, fax. +4871-3203469; e-mail: katarzyna.chojnacka@pwr.edu.pl

Wrocław, 28.02.2020

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Olgi Wrony

**pt. „Pozyskiwanie i oznaczanie substancji biologicznie aktywnych z
polskich roślin uprawnych z wykorzystaniem technik”**

Podstawa opracowania recenzji:

Pismo prof. Edwarda Szlyka - Dziekana Wydziału Chemii

Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

w sprawie wykonania oceny rozprawy doktorskiej

Pani mgr Olga Wrona wykonała pracę doktorską pod opieką prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, czł. koresp. PAN w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitik, Wydziału Chemii UMK w Toruniu. Promotorem pomocniczym był dr inż. Cezary Możeński, prof. INS w Puławach. Warto nadmienić, że praca realizowana była w ramach projektu NCN Preludium kierowanego przez Doktorantkę oraz projektu Biostrateg-Plantarum (finansowany przez NCBiR), którego Liderem jest Promotor prof. Bogusław Buszewski. Projekt ten zakończył się wprowadzeniem produktów zawierających ekstrakty SFE-CO₂ z lucerny i nawłoci na rynek przez firmę Pollena Eva (Grupa TZMO).

Pomysł realizacji pracy w dwóch ośrodkach: na UMK w Toruniu i w INS w Puławach jest świetnym połączeniem kompetencji w zakresie badań podstawowych (w tym zwłaszcza chemii analitycznej) oraz aplikacyjnych. Pan prof. B. Buszewski jest europejskim Liderem w zakresie metod separacyjnych związków organicznych, w tym substancji bioaktywnych pozyskanych z surowców naturalnych. Z kolei INS w Puławach jest europejskim liderem w badaniach i zastosowaniach przemysłowych procesów ekstrakcji surowców roślinnych płynami w stanie nadkrytycznym. Tak kompetentne doświadczenie promotorów zaowocowało **wybitnie wysoką jakością i**

wartością ocenianej rozprawy doktorskiej. Walorem pracy jest m.in. unikalne podejście do zwiększania skali procesów realizowanych w warunkach laboratoryjnych na ułamkowo techniczne, modelowe podejście do optymalizacji tych procesów poprzez badania ich mechanizmów oraz wpływu parametrów procesowych na wydajność definiowaną w dwojaki sposób (jako ogólną wydajność ekstrakcji z surowca oraz jako skład chemiczny ekstraktów). Dodatkową korzyścią takiej bi-dyscyplinarnej współpracy w obszarze chemii i inżynierii chemicznej jest opracowanie (chyba nieoczekiwane) pionierskiej metody analitycznej: chromatografii w stanie nadkrytycznym. Z obserwacji sposobu pracy Promotora wiem, że takie nieoczekiwane odkrycia i opracowywanie nowych technik analitycznych zdarzają się w Jego laboratoriach. Pracując pod tak doskonałą opieką merytoryczną, Doktorantka w umiejętny sposób zastosowała metody matematyczne i statystyczne do optymalizacji procesu i opracowania statystycznego wyników: model Box–Behnken (BBD) i metodologię powierzchni odpowiedzi (*Response Surface Methodology*, RSM). W ten sposób dokonała doboru parametrów procesowych: temperatury i ciśnienia, stosując analizę wariancji (*Analysis of Variance*, ANOVA). Jest to istotna nowość tej dysertacji przy przenoszeniu skali z laboratoryjnej do technicznej. Pani mgr O. Wrona dokonała oceny wpływu parametrów procesowych na wskaźniki: całkowitą wydajność procesu oraz stężenie wyizolowanych związków biologicznie czynnych. Optymalizacja procesu w skali ćwierć-technicznej umożliwiła przeniesienie skali do pół-technicznej. Surowcem był krajowy materiał roślinny: nawłóć olbrzymia (*Solidago gigantea* Ait.) i lucerna siewna (*Medicago sativa* L.), bogate w substancje biologicznie aktywne.

Rozprawa doktorska to cykl 6 monotematycznych publikacji, które ukazały się w czasopismach z listy JCR o łącznym współczynniku oddziaływania IF 14,3 (530 punktów ministerialnych). Są to publikacje, w których Doktorantka jest pierwszym autorem (5 prac) lub 3. autorem. W 2 pracach Doktorantka jest autorem korespondencyjnym, w 3 pracach Promotor, w 1 pracy dr hab. K. Rafińska. Do pracy załączono oświadczenia współautorów, z których wynika samodzielny wkład Kandydatki do stopnia doktora. Wyniki rozprawy opublikowano w następujących czasopismach: *Journal of AOAC International*, *Phytochemistry Letters*, *Przemysł Chemiczny*, *Industrial Crops and Products*, *Industrial Crops and Products*, *Molecules*. Publikacje te stanowią monotematyczny cykl i ułożone są w logiczną całość. Trzy prace poświęcone są przeglądowi literatury na temat ekstrakcji CO₂ w stanie nadkrytycznym surowców roślinnych i analizie wpływu parametrów procesu na wskaźniki. Kolejna

praca dotyczy charakterystyki związków biologicznie czynnych (m.in. flawonoidów, saponin) w ekstraktach roślinnych. W pracy D3 Kandydatka jest 3. autorem. W publikacji tej podjęto się przeglądu literatury dotyczącej optymalizacji ekstrakcji płynami w stanie nadkrytycznym i wykorzystania do tego celu metod modelowania matematycznego i statystycznych. Przegląd piśmiennictwa ujęty w pracach D1-D3 podaje aktualny stan wiedzy oraz wskazuje na luki, które w niej występują, a definiują cel i zakres pracy. W kolejnej publikacji doktorantka wykorzystała metodę planowania eksperymentów Box-Behnken Design to optymalizacji procesu ekstrakcji CO₂ w stanie nadkrytycznym biomasy rośliny *Solidago*. Dokonała również przeniesienia skali do półtechnicznej. Wykonywała analizy stężeń substancji biologicznie czynnych: polifenoli, lipidów, chlorofili ekstraktów i pozostałości poekstrakcyjnych. W kolejnej pracy (D4) Doktorantka przeprowadziła ekstrakcję płynami w stanie nadkrytycznym nawłoci olbrzymiej, dokonując procesu optymalizacji i zwiększenia skali. Wykorzystała do tego celu metodę analizy wariancji (ANOVA) oraz metodologię powierzchni odpowiedzi (RSM). Opracowała również autorską metodę analizy estrów metylowych kwasów tłuszczowych techniką GC-MS (D5). W pracy D6, Pani O. Wrona przeprowadziła ekstrakcję lucerny w skali ćwierć-technicznej i dokonała analizy stężenia związków polarnych w ekstrakcie: polifenoli i flawonoidów. Opracowała również metodę analityczną: chromatografię w stanie nadkrytycznym.

Celem rozprawy był dobór parametrów ekstrakcji CO₂ w stanie nadkrytycznym w skali ćwierć-technicznej materiału roślinnego nawłoci olbrzymiej oraz lucerny siewnej. Dokonano optymalizacji procesu, Jako kryteria optymalizacyjne przyjęto zawartość polarnych związków biologicznie czynnych, które ekstrahowano w warunkach wysokiego ciśnienia i temperatury. Celem było przeskalowanie procesu do skali pół-technicznej, jako podejście modelowe umożliwiające przejście do skali przemysłowej. Dodatkowym celem pracy było opracowanie nowej metody analitycznej chromatografii nadkrytycznej.

W realizacji pracy Doktorantka umiejętnie wykorzystywała różne techniki instrumentalne oraz separacyjne, co jest bez wątpienia mocną stroną tej pracy. Na uznanie zasługuje również sprawne posługiwanie się narzędziami matematycznymi i statystycznymi w planowaniu eksperymentów, modelowaniu procesów i ich optymalizacji.

Oceniana praca cechuje się wieloma aspektami **nowości**:

- W pracy wykazano, że proces ekstrakcji CO₂ w stanie nadkrytycznym jest determinowany dwoma parametrami: przez dyfuzję i rozpuszczalność. Są to najważniejsze kryteria przy powiększaniu skali. Jako pierwsze ekstrahowane są związki występujące na powierzchni materiału roślinnego lub tuż pod nią, a następnie z głębszych warstw rośliny. Doktorantka wykazała, że opór związany z dyfuzją zwiększa się wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej związku.
- Dokonano wyboru kryteriów optymalizacyjnych, m.in. ogólna wydajność ekstrakcji oraz zawartość składników: kwasów tłuszczowych (oznaczanych autorską metodą – estry metylowe kwasów tłuszczowych GC-MS).
- Opracowano modelową metodologię powiększania skali i doboru warunków ekstrakcji dla skali przemysłowej. Doktorantka zidentyfikowała 3 kryteria przenoszenia skali (temperatura, ciśnienia i szybkość przepływu rozpuszczalnika), co również ma znaczenie dla identyfikacji mechanizmów procesu. Wymienione 3 kryteria mają wpływ na wskaźniki. Doktorantka słusznie przyjęła, że są to wydajność procesu oraz zawartość związków biologicznie czynnych. Potwierdzenie tego Doktorantka uzyskała w analizie metodologii powierzchni odpowiedzi (RSM) i krzywizn płaszczyzn odpowiedzi.
- Opracowano pionierską metodę analityczną chromatografii nadkrytycznej SFC, która dzięki pracy w wysokim ciśnieniu, w którym CO₂ wprowadzany jest w stan nadkrytyczny, umożliwia oznaczanie niskich stężeń związków o dużej masie cząsteczkowej.
- Nieoczekiwanie okazało się, że nawłóć olbrzymia jest źródłem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym kwasu linolowego i alfa-linolenowego – ekstrakcja CO₂ w stanie nadkrytycznym mogłaby być interesującym kierunkiem komercjalizacji w otrzymywaniu suplementów diety dla człowieka.

Chciałabym podkreślić, że w ocenianej rozprawie, nie dostrzegłam potknięć: w opisie, nieścisłości sformułowań, czy błędów edycyjnych. Zapytania do Doktorantki nie mają istotnego wpływu na moją wyjątkowo pozytywną ocenę merytoryczną rozprawy. Zasadnicze uwagi i komentarze dotyczące rozprawy doktorskiej mgr O. Wróny przedstawiono poniżej. *Uwagi stanowią zbiór pewnych otwartych sugestii do dyskusji podczas obrony. Podkreślam, że wyniki tej pracy zostały w całości opublikowane.*

Praca ma charakter interdyscyplinarny: jest z pogranicza chemii związków naturalnych, chemii analitycznej i inżynierii chemicznej.

Poniżej przedstawiono uwagi szczegółowe i zapytania:

1. Czy w pracy D6 ekstrakcja związków polarnych była prowadzona samym CO₂ w stanie nadkrytycznym (który jest niepolarny), czy w obecności współrozpuszczalnika polarnego (np. alkoholu etylowego). Czy byłyby takie możliwości techniczne w instalacji przemysłowej w INS w Puławach? Czy zastosowanie polarnego ko-ekstrahenta mogłoby istotnie zwiększyć wydajność ekstrakcji związków polarnych, takich jak polifenole?
2. Str. 26 „ilość flawonu (22,0 mikrog/g DM) – powinno być „zawartość”
3. Doktorantka przeprowadziła samodzielnie ekstrakcję CO₂ w stanie nadkrytycznym nawłoci olbrzymiej i lucerny siewnej w instalacji ćwierć i półtechnicznej w INS w Puławach. Instalacja ćwierć-techniczna – o objętości 1 L posłużyła do ekstrakcji 150 g materiału. Czy adekwatne jest używanie nazwy ‘ćwierć-techniczna’? Być może ‘wielkolaboratoryjna’ byłoby lepszym odzwierciedleniem skali procesu? Proces w skali pół-technicznej to ekstraktor o pojemności 40 L, wsad surowca 4,5 kg. Biorąc pod uwagę skalę instalacji przemysłowej (pojemność ekstraktora 6 m³), być może ‘ćwierć-techniczna’ byłaby bardziej właściwa?
4. Rozdział „4. Podsumowanie i wnioski” – rozdzieliłabym na dwa: 4. Podsumowanie, 5. Wnioski, zwłaszcza, że wnioski stanowią odrębną część tego rozdziału.
5. Str. 115 i w wielu innych miejscach pracy „z wykorzystaniem nadkrytycznego ditlenka węgla”. Jest to ujęcie kolokwialne. Bardziej prawidłowo powinno być „z wykorzystaniem CO₂ w stanie nadkrytycznym”.
6. Wniosek na stronie 116, mówiący, że w zależności od rodzaju materiału i wybranego kryterium odpowiedzi konieczna jest indywidualna interpretacja wyników, ponieważ uzyskano różne parametry procesu ekstrakcji. Wniosek ten jest niejednoznaczny. Poprosiłabym o doprecyzowanie.
7. Doktorantka wskazała, że powiększanie skali zależy od wybranego kryterium optymalizacyjnego – poproszę o komentarz. Ze względu na wydajność procesu lub ze względu na skład ekstraktu zoptymalizowane wartości parametrów procesowych są inne?

Przedstawione powyżej uwagi i zapytania mają charakter szczegółowy lub dyskusyjny i nie podważają ogólnej **bardzo pozytywnej** oceny pracy. Mgr Olga Wrona podjęła w swej rozprawie ważne i złożone zagadnienia w zakresie ekstrakcji związków biologicznie aktywnych płynami w stanie nadkrytycznym. Przedstawione w pracy wyniki doświadczalne stanowią wartościowy materiał, zmierzający do zastosowań praktycznych w skali przemysłowej. Niniejsza praca stanowi również modelowe i wzorcowe podejście do optymalizacji procesu w skali technicznej. Stwierdzam, że mgr Olga Wrona wykazała się wiedzą niezbędną do prowadzenia prac w zakresie nauk chemicznych oraz umiejętnością analizy i prezentacji wyników badań.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wymagania określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami Dz. U. z 2005 r. nr 164 poz. 1365, Dz. U. z 2011 r. nr 84 poz. 455, Dz.U. z 2017 poz. 1789 ze zm.) w zw. z art. 179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.), i wnoszę o dopuszczenie mgr Olgi Wrony do publicznej obrony. Ponadto, biorąc pod uwagę jakość merytoryczną i wartość praktyczną tej pracy oraz pionierski charakter przeprowadzonych badań, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Krzysztof Chyba