

Prof. dr hab. inż. Henryk Górecki
Instytut Nowych Syntez Chemicznych
W Puławach
Przewodniczący Rady Naukowej

Wrocław, dn. 22.08.2017

Recenzja
rozprawy doktorskiej
mgr Joanny Fabrowskiej
pod tytułem

**Metody izolacji i analiza związków bioaktywnych z wybranych zielenic
słodkowodnych**

*Podstawa wykonania recenzji:
Pismo Dziekana Wydziału Chemicznego
Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu
L.dz.WCH/199/GW/2017 z dnia 4 lipca 2017*

Ogólna charakterystyka pracy doktorskiej

Przewód doktorski mgr Joanny Fabrowskiej prowadzony jest przez Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, wydziału o szerokim spektrum aktywności naukowej w dziedzinie nauk chemicznych, w tym również w zakresie badań nad związkami bioaktywnymi. Praca doktorska również została wykonana na tym wydziale pod kierunkiem Pani dr hab. Bogusławy Łęskiej prof.UAM. Z życiorysu naukowego doktorantki wynika, że ma pełne kwalifikacje i kompetencje do realizacji zadań, które były przedmiotem pracy doktorskiej. Licencjat uzyskała na wydziale Chemicznym Uniwersytetu im.Marii Skłodowskiej Curie w Lublinie w roku 2011, a prace magisterską o tematyce zbieżnej z pracą doktorską pt."Zastosowanie alg i ekstraktów glonowych w kosmetyce" wykonała pod kierunkiem późniejszego promotora i obroniła w roku 2013. Bezpośrednio po studiach została uczestnikiem studiów doktoranckich na Wydziale Chemii UAM, odbywając w ramach programu Erasmus staże naukowe w Institute of Food Research /CIAL/ w Madrycie /6 miesięcy/ oraz w Zakładzie Chemii Analitycznej w Universidad Valencia /3 miesiące/. Doktorantka odbyła również krajowy staż naukowy w zakresie analizy związków bioaktywnych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego. Prace badawcze Doktorantki zostały wykonane i sfinansowane w Programie Badań Stosowanych NCBR w ramach projektu rozwojowego pt. Innowacyjne technologie ekstraktów glonowych-komponentów nawozów, pasz i kosmetyków" oraz projektu NCN pod nazwą; "Fizykochemiczne i biologiczne przyczyny ekologicznej dominacji zielenic nitkowych w wodach śródlądowych".

Tematem pracy doktorskiej jest identyfikacja i opracowanie metod izolacji wybranych grup związków bioaktywnych zawartych w słodkowodnych zielenicach występujących w wodach śródlądowych na terenie Polski, z założeniem, że te nowe biologiczne produkty

mogą być wykorzystane gospodarczo do wytwarzania produktów o projektowanych właściwościach, w tym przykładowo w kosmetyce. Tego typu rozwiązanie można uznać za nowatorskie, gdyż w przeciwieństwie do glonów morskich baza surowcowa jaką są zielenice jak wynika to z przeglądu literatury dokonanej przez Doktorantkę nie była dotychczas przedmiotem zainteresowania i badań naukowych, dowodem tego są nieliczne publikacje. Podjęcie się badań w tym nowym obszarze uważam za w pełni uzasadnione i zgodne z zasadami zrównoważonego rozwoju z dwóch istotnych powodów. Pierwszym argumentem jest uzasadnione poszukiwanie aktywnych biologicznie składników, które nie są wynikiem syntezy chemicznej, ale pochodzą z biomasy. Zapotrzebowanie na tego typu substancje jest znacznie większe niż to przedstawiła Doktorantka, a dotyczy to zwłaszcza rolnictwa, gdzie stosowanym obecnie agrochemikaliom stawia się coraz większe ograniczenia i wyjątkowo skomplikowane i kosztowne procedury rejestracyjne. Przemysł nawozowy oraz środków ochrony roślin zminimalizował oddziaływanie fazy produkcji na środowisko, ale wciąż otwartym problemem jest efektywność tych środków, duże ładunki tych substancji przemieszczane do środowiska /wody powierzchniowe, gleba, atmosfera/, a przede wszystkim wprowadzanie pozostałości tych środków do łańcucha pokarmowego zwierząt hodowlanych i człowieka. Drugim argumentem uzasadniającym potrzebę badań ukierunkowanych na praktyczne wykorzystanie makroalg słodkowodnych jako surowca jest potencjalna możliwość usunięcia z wód powierzchniowych zbędnego balastu będącego efektem eutrofizacji, pogarszającego ich jakość i użyteczność tych wód. W przypadku utylizacji zebranych z jezior zielenic, nie tylko można uzyskać dodatkową wartość dodaną ze względu na niski koszt surowcowy, ale możliwe jest uzyskanie wartości dodanej za poprawę jakości wód powierzchniowych. Stosowanie biomasy jako surowca naturalnego nie jest pozbawione problemów technologicznych. Problemy te związane są z niejednorodnością surowca nawet pozyskiwanego z jednego źródła, podatnością surowca na zmiany składu w trakcie wstępnej obróbki i magazynowania, potrzebą oczyszczenia i przygotowania formy surowca do operacji izolacji różnych składników, a także wahaniami w składzie produktów finalnych. Uwarunkowania te powodują zastosowanie zupełnie odmiennego schematu technologicznego w stosunku do tradycyjnego modelu bazującego na syntezie chemicznej, gdzie substrat i uzyskiwany produkt mają stały skład. Istotą procesów wykorzystujących biomasę jako surowiec nie jest reakcja chemiczna, ale racjonalne i optymalne, selektywne wydzielenie z niej cennych składników. Potencjalny model przetwarzania zielenic wymusza więc określone zadania badawcze i zastosowanie adekwatnej procedury badawczej.

Doktorantka swój program badawczy określiła potrzebą odpowiedzi na trzy pytania:

- czy biomasa glonów słodkowodnych może stanowić potencjalnie nowy surowiec bogaty w związki biologicznie czynne ?
- jakie substancje czynne są obecne w makroalgach słodkowodnych?
- która metoda izolacji jest najlepsza do izolacji określonych substancji ?

Z tak sformułowanego schematu badań sformułowany cel badań to opracowanie i optymalizacja procesów izolacji konkretnych substancji biologicznie czynnych zawartych w zielenicach, poprzedzony identyfikacją składu zielenic z dwóch akwenów. Osiągnięcie tak

sformułowanego celu pozwala na sformułowanie wstępnej koncepcji technologicznej, popartej dowodem użyteczności potencjalnych produktów do celów kosmetycznych.

Ocena nowości i oryginalności osiągnięcia, będącego przedmiotem pracy doktorskiej

Rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie cykl artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Cykl ten stanowi 5 publikacji opublikowanych w Open Chemistry, Algal Research/2 publikacje/, Acta Poloniae Pharmaceutica, w Chemiku oraz w formie rozdziału w monografii. Cztery z tych prac opublikowane są w czasopismach indeksowanych w bazie JCR, w tym 2 w czołowym czasopiśmie specjalistycznych Algal Research publikujące osiągnięcia z obszaru problematyki glonowej, o wysokim współczynniku oddziaływania $IF=5,303$. Sumaryczny współczynnik IF publikacji ujętych w rozprawie wynosi $IF=12,838$.

Przedstawiona do oceny „Rozprawa doktorska” składa się z przewodnika omawiającego wyniki badań Doktorantki, składającego się z 6 rozdziałów, w których przedstawiła charakterystykę badanych zielenic słodkowodnych, przedstawiła stosowane metody izolacji związków bioaktywnych z glonów i wyniki z tych procesów prezentowanych w 3 publikacjach(zał,1,2,3) oraz wyniki badań nad zastosowaniem ekstraktów z zielenic słodkowodnych w kosmetyce. W opracowaniu rozdz.6 stanowi „*Dorobek naukowy*” obejmujący *Życiorys naukowy, Listę publikacji Doktorantki, w tym publikacji, które nie ujęto w rozprawie oraz wygłoszone i opublikowane referaty z konferencji międzynarodowych i krajowych. W rozdz. 7 przedstawiono spójny tematycznie cykl następujących publikacji: Biomass Of freshwater Cladophora as Raw material for agriculture and cosmetics industry (Open Chemistry), Supercritical fluid extraction as tool to valorize underexploited freshwater Green alga (Algal Research), First isolation of polysaccharidic ulvans from the cells walls of freshwater algae (Algal Research), In vivo studies and stability study of Cladophora glomerata extract as a cosmetic active ingredient (Acta Poloniae Pharmaceutica), Słodkowodna Cladophora glomerata jako nowy potencjalny surowiec kosmetyczny (Chemik), Ulwany-biologicznie czynne siarczanowe polisacharydy izolowane z zielenic (rozdział monografii „Rośliny-przegląd wybranych zagadnień „wydawnictwo WN Tygiel” /,*

Uważam, że jest spełniony warunek określony w Art.13.2 ustawy o stopniach naukowych i tytule profesora, że rozprawę doktorską może stanowić „spójny tematycznie cykl publikacji opublikowanych w czasopismach naukowych określonych przez ministra właściwego do spraw nauki.” Do rozprawy załączono dokumentację pn . Ankieta dorobku naukowego doktorantki, w której szczegółowo określono rolę Doktorantki i Jej wkład intelektualny i badawczy w każdej wieloautorskiej publikacji wchodzącej w skład cyklu publikacji stanowiącego rozprawę doktorską. Potwierdzeniem tej informacji są załączone oświadczenia sygnowane przez współautorów publikacji. Wszystkie publikacje są wieloautorskie, co wynika z multidyscyplinarnej metodyki badawczej, wynikającej z przedmiotu badań, a także ukierunkowania badań na potencjalnie możliwe wykorzystanie wyników badań do praktyki gospodarczej. Doktorantka w publikacjach z tego cyklu ma udział

od 20 do 90 %-średnio 57%. W publikacjach z tego cyklu jest pierwszym autorem w dwóch publikacjach /nie stosowno układu alfabetycznego/ i w dwóch publikacjach jest autorem korespondencyjnym. Uważam , że jest spełniony zapis ustawowy odnoszący się do prac wieloautorskich, że zgodnie z Art.13 ust4 „Rozprawę doktorską może także stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywania części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji , odpowiadającej ust.1”. Opinię tę uzasadniam po zapoznaniu się z 72 stronicowym opracowaniem, które interpretuję jako wydzielenie wkładu własnego, a także po analizie oświadczeń współautorów.

Uważam również, że spełniony jest warunek ustawowy Art.13 ust.1, ustalający że rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz powinna wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Uzasadnieniem spełnienia warunku nowości i oryginalności rozprawy jest niewątpliwie przedmiot badań, jakim są zielenice słodkowodne jako potencjalny surowiec naturalny dla różnych zastosowań, a także testowanie możliwości izolacji różnych wartościowych i użytecznych składników, klasyczną metodą ekstrakcyjną z wykorzystaniem aparatu Soxhleta, nowoczesnej metody ekstrakcji SFE w warunkach nadkrytycznych z wykorzystaniem ditlenku węgla, a także ekstrakcji enzymatycznej typu EAE. Doktorantka dokonała izolacji chemicznej i identyfikacji różnych naturalnych składników zielenic oraz ekstraktów nowoczesnymi metodami instrumentalnymi takimi jak analizą elementarną ,chromatografią gazową , chromatografią cieczową z detekcją UV-VIS sprzężona ze spektrometrią mas HPLC-DAD-MS, spektrometrią UV-VIS oraz spektroskopię w podczerwieni FT-IR, analizą elementarną ,spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego NMR, analizę mikroelementową z wykorzystaniem indukcyjnie sprzężonej plazmy z wykorzystaniem spektrometru optycznego ICP-OES. Próbkę do analiz makro- i mikroelementów były przez Doktorantkę mineralizowane w sposób mikrofalowy w zamkniętych bombach teflonowych z użyciem systemu Milestone. Badania nad identyfikacją składu zielenic oraz ekstraktów, a także badania nad ekstrakcją , biorąc pod uwagę stosowane procedury badawcze i skalę eksperymentów miały charakter rozpoznawczych badań podstawowych.Odmienny charakter miały badania aplikacyjne nad zastosowaniem wyselekcjonowanych makroglonów słodkowodnych do formulacji kosmetycznych. W tej fazie badań testowano właściwości antyoksydacyjne w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem ekstraktów glonowych metodą TEAC/ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, a także 4-tygodniowe badania właściwości użytkowych jako kremów nawilżających w badaniach *in vivo* z udziałem ochotników. Do najważniejszych osiągnięć pracy można zaliczyć identyfikację substancji bioaktywnych w badanych gatunkach słodkowodnych zielenic(*C.glomerata*,*C.fragilis*,*U.flexuosa*), takich jak kwasy tłuszczowe, aminokwasy, karotenoidy i polifenole, siarczanowe polisacharydy (ulwany), wykazując eksperymentalnie jaką metodę izolacji należy zastosować do wydzielenia tych substancji z zielenic. W badaniach aplikacyjnych wykorzystano wykryte właściwości antyoksydacyjne , nawilżające i uelastyczniające skórę ,a w badaniach

aplikacyjnych in vivo z udziałem ochotników stosujących emulsje kosmetyczne typu O/W zawierające ekstrakt z zielenicy *C.glomerata* wykazano korzystne właściwości użytkowe.

Uwagi krytyczne

Forma rozprawy doktorskiej, jaką jest cykl publikacji w renomowanych czasopismach sprawia, że wcześniej recenzenci, a także redakcja oraz recenzenci sprawili, że uwag krytycznych jest niewiele.

- w publikacji w Open Chemistry w tab.1 i 3 jako jednostkę określającą zawartość substancji w zielenicach podawano $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DM}$ / dry mass/ . Wyniki więc zawartości poszczególnych pierwiastków muszą być mniejsze od 1.0. Przypuszczam , że prawidłowy zapis to $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{DM}$
- w publikacji w Algal Research schemat aparaturowy przedstawiono w zbyt uproszczonej formie. Brakuje określenia kierunku obiegu strumieni materiałowych. Ponadto z tekstu artykułu wynika, że jest to własnej konstrukcji aparatura, o bardzo małej zdolności przerobowej-2 ml/min i wsadzie 0.5 g suchej masy makroalg. W tabeli 1 podano „experimental design matrix” np. . ciśnienia 100,200,300 bar. Czy rzeczywiste ciśnienia w ekstraktorze miały taką dokładną wartość?
- Doktorantka w rozdziale 4.2.2 przedstawia identyczny schemat i zbyt lakoniczny i bardzo uproszczony opis procedury ekstrakcji ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym. Zmienić należy sformułowanie „wzrasta tempo ekstrakcji”, „wysoka dyfuzyjność”.
- Niezbyt trafne są opinie o wadach i zaletach metody. Ekstrakcję nadkrytyczną coraz powszechniej używa się do przetwarzania biomasy w sposób sezonowy , a więc wskaźniki ekonomiczne zależą od czasu wykorzystania instalacji, a także wielkości partii poszczególnych wsadów surowcowych, gdyż zmiana surowca powoduje potrzebę czyszczenia instalacji. Naturalnie duże instalacje mają niższe koszty jednostkowe produkcji , a także niższe koszty ponoszą instalacje zlokalizowane na terenie kombinatów dysponujących odpadowym ditlenkiem węgla /np.ZA Puławy SA/
- O tym, że ekstrakcja nadkrytyczna jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się technik ekstrakcji nie świadczy „znacząca ilość publikacji na ten temat”, ale budowane i pracujące instalacje o bardzo dużej zdolności produkcyjnej w przemyśle spożywczym, petrochemicznym, farmacji. Technika ta w dużej skali stosowana jest od ponad 20 ., w Polsce od 15 lat.
- Czy fotografia na rys. 6 ilustruje urządzenie do ekstrakcji wykorzystywane w publikacji zał.2./ home-made SFE instrument/, czy jest to jedno ze stanowisk badawczych Zakładu Ekstrakcji Nadkrytycznej w Instytucie Nowych Syntez Chemicznych w Puławach ?
- Doktorantka testowała użyteczność kilku różnych metod izolacji substancji zwartych w zielenicach. Testowała użyteczność konwencjonalnej ekstrakcji z użyciem aparatu Soxhleta, a także nowoczesnej metody ekstrakcji SFE w warunkach nadkrytycznych z ditlenku węgla, a także ekstrakcji enzymatycznej typu EAE. W rozdz.4.2 przewodnika powołując się na wyniki zamieszczone w publikacjach przedstawiła użyteczność tych metod w podrozdziałach 4.2.1,4.2.2, 4.2.3 , a także w podrozdziale 4.2.4 pt. Ekstrakcja poprzez mineralizację mikrofalową. Traktowanie mineralizacji mikrofalowej jako metody izolacji , tak jak w przypadku wymienionych metod jest nieuzasadnione i to kilku względów. W procesie

mineralizacji, który został wykorzystany w badaniach Doktorantki zastosowano ciśnieniowy system mineralizacji w zamkniętych bombach teflonowych, umieszczonych w rotorze. Umieszczenie próbek zielenic w pojemnikach wraz z roztwarzającym biomasę stężonym kwasem azotowym powoduje pod wpływem promieniownia mikrofalowego ogrzanie mieszaniny do wysokich temperatur i uzyskanie wysokiego ciśnienia co wywołuje efekt kawitacji, z tworzeniem się w sposób dynamiczny pęcherzyków parowo-gazowych, swoistych fal udarowych powodujących destrukcję materiału i jego rozpuszczenie. W efekcie uzyskujemy pełny rozkład próbki do formy roztworu, a więc formy wymaganej przez spektrometrię plazmową ICP. Naturalnie istnieje możliwość wydzielania z próbki różnych substancji, ale to wymaga stosowania odpowiednich rozpuszczalników, a także innego systemu aparaturowego/ np. zastosowanie sondy generującej mikrofałe, zastosowanie systemu NEOS, systemu MAE, umożliwiającego gromadzenie i odseparowanie ekstraktu. Prawidłowym określeniem tej techniki jest nazwa-ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami. Z analizy tego rozdziału wynika prawidłowy opis stosowanej procedury mineralizacji i taki powinien być tytuł rozdziału.

-do czynników utrudniających interpretacje wyników, a także w przyszłości przy potencjalnym wykorzystywaniu biomasy jako surowca do różnych zastosowań jest problem zmienności składu pobieranych makroalg słodkowodnych. W pracy doktorskiej wykazano różnice między składem makroalg w zależności od gatunku i możliwością uzyskania określonych substancji. Skład ten z pewnością zależy również od składników zanieczyszczających wody powierzchniowe, zwłaszcza dotyczy to makroskładników powodujących wzrost organizmów. W rolnictwie wykazano istotne korelacje między składem gleby i uprawianych roślin, podobnie jak w przypadku upraw hydroponicznych między składem roztworu bazowego, a składem roślin. Nie jest to uwaga krytyczna, ale sugestia odnośnie kontynuacji badań w tym zakresie i powiększaniu skali badań.

Podsumowanie

W rozdziale opinii dotyczącym formy rozprawy doktorskiej, a także oceny merytorycznej pracy szczegółowo odniosłem się do warunków ustawowych, która moim zdaniem rozprawa spełnia. W opinii zwróciłem uwagę na multidyscyplinarny jej charakter, a także na konieczność wykonywania zadań badawczych przez wielu wykonawców, wspomagających Doktorantkę w specjalistycznych pomiarach i eksperymentach. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i organizacji badań, poznała szereg nowoczesnych technik z zakresu analizy instrumentalnej, a także metod izolacji różnych substancji technikami ekstrakcyjnymi. Doktorantka miała możliwość wykorzystania nowoczesnej infrastruktury badawczej macierzystego wydziału, ale również umiejętnie wykorzystała możliwość zwiększenia swoich kompetencji badawczych w ośrodkach zagranicznych. Podkreślenia wymaga również fakt realizacji i finansowania pracy w ramach programu badań stosowanych finansowanych przez NCBR oraz projektu badawczego przyznanego przez NCN. Przedstawione uwagi krytyczne nie obniżają mojej pozytywnej oceny rozprawy.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, a także wymagania Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 14 października 2014 r./Dz.U. 2014 poz.1384/ w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. **Wnoszę o dopuszczenie mgr Joanny Fabrowskiej do publicznej obrony.**



1.