



SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W WARSZAWIE
INSTYTUT NAUK O ŻYWNOSCI
KATEDRA INŻYNIERII ŻYWNOSCI I ORGANIZACJI PRODUKCJI

dr hab. inż. Emilia Janiszewska-Turak

Warszawa, 21.03.2022

Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji

Instytut Nauk o Żywności

SGGW w Warszawie

Email: emilia_janiszewska_turak@sggw.edu.pl

Tel: +48 22 5937366

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Mariusza Banacha

Zatytułowanej „Wykorzystanie i optymalizacja zaawansowanych technik rozdzielczych do pozyskiwania i zatężania antocyjanów, jako składnika żywności funkcjonalnej”

Wykonanej w Katedrze Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów pod kierunkiem Prof. dr hab. Wojciecha Kujawskiego; Opiekun pomocniczy Mgr Wojciech Cyplik

Formalna ocena pracy

Tematyka pozyskiwania ekstraktów związków aktywnych, do jakich zaliczyć można antocyjany, pochodzących z surowców naturalnych jest obecnie zagadnieniem popularnym i jednocześnie charakteryzującym się dużymi możliwościami badawczymi oraz aplikacyjnymi. Poruszany w celu i uzasadnieniu pracy doktorskiej problem uzyskania wysokiego stężenia przy jednoczesnym zachowaniu funkcjonalności związków aktywnych, jest niezwykle istotny. Jednocześnie surowiec wybrany do badań, bez czarny, borówka czarna i aronia, ze względu na wysokie zawartości antocyjanów jest właściwy. Ponadto zastosowanie różnych form w/w owoców wskazuje na wpisanie tematyki badawczej, w obecnie coraz mocniej rozpowszechniony trend, i konieczność zagospodarowania odpadów przemysłu spożywczego. Proces ekstrakcji i separacji związków aktywnych bogatych w antocyjany, a następnie przekształcenie ich w formę stałą, zapewniającą im długotrwałe przechowywanie. Ponadto, poruszany aspekt braku możliwości wysuszenia rozpyłowo otrzymanych ekstraktów bez dodatku nośnika, świadczy o dobrej znajomości tej tematyki.

Oznacza to, że podjęcie przez mgr Mariusza Banacha badań związanych z ekstrakcją oraz efektywną separacją umożliwiającą usunięcie substancji utrudniających suszenie, a także opracowaniem technologii produkcji suchych ekstraktów roślinnych z w/w owoców jagodowych

standaryzowanych na wysoką zawartość antocyjanów, wynikającą między innymi z norm europejskich, zarówno z punktu widzenia naukowego, jak i praktycznego jest uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Mariusza Banacha pt: „Wykorzystanie i optymalizacja zaawansowanych technik rozdzielczych do pozyskiwania i zateżnienia antocyjanów, jako składnika żywności funkcjonalnej” została wykonana w Katedrze Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów pod kierunkiem Prof. dr hab. Wojciecha Kujawskiego oraz opiekuna pomocniczego Mgr Wojciecha Cyplika. Praca obejmuje 150 stron maszynopisu w tym 1 stron aneksu. W tekście pracy zamieszczono 35 rysunków, a także 20 tabel. Praca podzielona jest na części prezentujące wykaz ważniejszych oznaczeń, wprowadzenie, część literaturową, cel pracy wraz z zakresem pracy, część eksperymentalną zawierającą opis materiałów i użytych metod badawczych, część zawierającą wyniki badań wraz z ich analizą, wnioski jak również spis literatury, rysunków, tabel, załączniki pokazujące zastosowanie uzyskanych w pracy efektów doświadczeń. Na końcu rozprawy został przedstawiony spis dorobku naukowego doktoranta uwzględniający liczbę opublikowanych artykułów (wraz z ich punktacją MNIe oraz IF), złożone i otrzymane patenty, udział w konferencjach oraz uzyskane projekty.

W pracy cytowanych jest 236 pozycji literatury w 99% anglojęzycznej, w tym 40% (94) pochodzi z okresu ostatnich 5-ciu lat oraz 63% (148) pozycji z okresu ostatnich 10-ciu lat. Świadczy to o aktualności cytowanej literatury i o bieżącym śledzeniu omawianego zagadnienia przez Autora, jak i o aktualności podejmowanego zagadnienia. Prezentacja wyników, a także ich dyskusja są przedstawione w sposób prosty i logiczny. Stosowana nomenklatura oraz język w większości są poprawne. Z formalnego punktu widzenia praca nie budzi wątpliwości.

Merytoryczna ocena pracy doktorskiej

Część literaturowa zawiera omówienie najważniejszych zagadnień dotyczących problematyki rozprawy i stanowi około 25% maszynopisu. Doktorant w pierwszym rzędzie skupia się na opisie surowców jakie używane są w zaplanowanych eksperymentach. Opis owoców jagodowych z podziałem na aronię czarnoowocowej, bez czarny oraz borówkę czarną został przedstawiony na ok 6 stronach pracy. W kolejnym podrozdziale, na 6 stronach, doktorant omawia strukturę i właściwości związków czynnych występujących w w/w owocach a także skupia się na rodzaju ekstrakcji mającej za zadanie wydobycie z surowca możliwie jak największej ilości tych substancji. Dodatkowo poruszane jest zagadnienie oznaczania antocyjanów różnymi metodami. Trzeci rozdział przeglądu, zajmujący 9 stron maszynopisu, dotyczy omówienia metod separacyjnych, wśród których mgr Banach wymienił chromatografię preparatywną oraz ciśnieniowe procesy membranowe. Procesy membranowe zostały w tym rozdziale omówione bardzo szczegółowo z uwzględnieniem ich charakterystyki, rodzaju stosowanych membran, najważniejszych parametrów oraz ich wykorzystaniu w przemyśle

spożywczym. Czwarty rozdział, przedstawiony na 2 stronach maszynopisu, dotyczy suszenia rozpyłowego ekstraktów roślinnych.

Poruszane w części literaturowej zagadnienia są poprawnie dobrane i dobrze uzasadniają podjętą tematykę badawczą. Ponadto podział i rozbudowa poszczególnych rozdziałów jest prawidłowa, gdyż to techniki separacyjne są główną metodą do rozdzielenia i zatężenia antocyjanów z wybranych surowców owocowych.

W przeglądzie zdarzały się drobne uchybienia jak: powtórzenia słowne w obrębie jednego zdania, niedokończone zdania oraz potoczne sformułowania. Jeśli praca będzie w późniejszym okresie publikowana, należy zwrócić uwagę na te kwestie.

1. Str. 13 - ...Profil antocyjanów czarnego bzu jest bardzo charakterystyczny. **Większość to 3-O-sambubiozyd i 3-O-glukozyd cyjanidyny.**
2. Str. 15 - ...**Zgodnie z pracą przeglądową** Pires i wsp. [45] w owocach borówki czarnej zidentyfikowano...
3. Str. 20 - .. Niektóre enzymy stosowane do ekstrakcji lub wyłaczania soku mogą również modyfikować charakterystyczny **dla danego owoców** profil antocyjanów.
4. Str. 22 - **Utrudnieniem** w identyfikacji konkretnych substancji z tej grupy jest **utrudniona** dostępność wzorców wielu antocyjanów występujących w przyrodzie.

Zastanawia mnie w rozdziale 4 str. 33 ostatnie zdanie, a dokładnie ostatnie powołanie się na białka serwatkowe? (Dzięki bardzo krótkiemu kontaktowi z wysoką temperaturą, nadaje się do suszenia substancji termolabilnych, takich jak antocyjany [150,155], β -karoten [154], enzymy [156] oraz białka serwatki [157].) Czym zasłużyły sobie białka serwatkowe na wymienienie w tym zdaniu? Prędzej widziałbym tutaj betalainy, chlorofile będące składnikiem aktywnym i wrażliwym na temperaturę niż białka serwatkowe. Wydaje mi się iż tego typu związków z owoców branych do badań nie wyekstrahujemy. Proszę o uzasadnienie takiego doboru literatury.

Drugą część pracy stanowi cel i zakres badań, przedstawiony przez doktoranta na dwóch stronach maszynopisu. Celem badań było opracowanie technologii produkcji suchych ekstraktów roślinnych z owoców jagodowych (aronii, bzu czarnego oraz borówki czarnej), standaryzowanych na wysoką zawartość antocyjanów, wykorzystywanych w suplementach diety oraz jako barwnik spożywczy. Następnie doktorant uszczegółowił etapy pracy, mające na celu uzyskanie wysuszonych ekstraktów. Ponadto ze względu na charakter doktoratu – doktorat wdrożeniowy - zostały zaplanowane badania zarówno w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej. Dodatkowo, przed wypuszczeniem produktu na rynek, zostały wykonane badania *in vitro* mające na celu zbadanie właściwości biologicznych ekstraktów.

Uważam, że postawiony w pracy cel i zakres badań są sformułowane prawidłowo. Potwierdzeniem trafności i istotności realizowanych badań jest również fakt współpracy i wdrożenia efektów badań w firmie Greenvit sp. z o.o.

Cel i etapy pracy są poprawnie określone i podzielone.

Uwagi do tej części pracy:

1. W opisie realizacji celów: „Realizacja tak postawionego głównego celu pracy wymagała ... separację umożliwiającą usunięcie substancji utrudniających suszenie **z jednoczesnym wzbogaceniem** ekstraktu w antocyjany i inne polifenole.” Pytanie moje dotyczy wzbogacania ekstraktów. W jaki sposób według doktoranta było możliwe wzbogacanie, lub co Pan miał na myśli używając tego wyrażenia? W pracy nie ma wspomnianego etapu dodawania antocyjanów i innych polifenoli do uzyskiwanych na poszczególnych etapach badań ekstraktów. Ekstrakcja, zateżnienie/zagęszczenie a także suszenie rozpyłowe substancji aktywnych, czyli procesy usuwające wodę, a w przypadku wybranych metod membranowych też niskocząsteczkowych substancji, nie może być traktowane jako wzbogacanie. Moim zdaniem możemy mówić jedynie o wzroście zawartości tych substancji w produkcie po procesie, wynikającym z usunięcia wody i jednoczesnym wzroście suchej masy.

W kolejnym rozdziale (III) zaprezentowanym na 12 stronach maszynopisu, Autor opisał metody badawcze użyte w omawianych badaniach. W opisie zawarte zostały materiały badawcze, odczynniki i surowce chemiczne jaki i metody analityczne i przemysłowe stosowane na każdym etapie badań. W niektórych opisach metod badawczych zabrakło mi szczegółowych danych. Częściowo pojawiają się one w rozdziale omawianie wyników, jednakże wpisanie ich w metodyce znacznie ułatwiłoby zrozumienie poszczególnych działań jakie Autor wykonywał w pracy. Prosiłabym o ich sprecyzowanie podczas obrony.

Uwagi

1. 6.4.1 Ekstrakcja antocyjanów – skala laboratoryjna – brak rodzaju użytego rozpuszczalnika, zastosowanych stężeń i kolejności wykonywanych badań na poszczególnych analizowanych owocach. Warunki ekstrakcji – ciśnienie, temperatura, czas także są nieznane.
2. 6.4.4.Suszenie rozpyłowe:
 - a. Jaki ekstrakt poddawano suszeniu rozpyłowemu? W przeglądzie w rozdziale 4 wspomniano iż niemożliwe jest wysuszenie ekstraktu bez dodatku nośnika. W jakiej ilości % wagowych dodawany był nośnik? Co zostało wybrane jako nośnik i dlaczego? W jaki sposób zapewniano homogeniczność roztworu?
 - b. Na jakiej podstawie dobrane zostały parametry temperatury na wlocie do suszarki?

- c. Jak, zarówno w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej kontrolowano temperaturę na wylocie?
 - d. Jak duże próbki były jednorazowo suszone?
 - e. Do pytania poprzedniego – jeśli próbki były duże czy obserwowany był wzrost temperatury obudowy suszarki, co prowadzi do wzrostu temperatury na wylocie? Jeśli było to obserwowane – jak było to kompensowane?
 - f. Prosiłabym o podanie prędkości dysków w rpm nie Hz.
3. 6.5.3. oznaczanie suchej masy ekstraktów – Zastosowana temperatura suszenia dla ekstraktów jest bardzo wysoka, zazwyczaj tam gdzie są składniki aktywne stosowana jest niższa. Dla formy płynnej jest to 70°C – ekstrakt jest наносzony na zwiniętą bibułę w celu uniknięcia przypalenia, dla proszków stosuje się 105°C. Proszę podać wg jakiej metodyki/literatury ustalono taką temperaturę oznaczania suchej masy w pracy?

Rozdział IV, „Omówienie wyników”, zaprezentowany na 55 stronach maszynopisu, stanowi charakterystykę najważniejszych wyników badań. W poszczególnych podrozdziałach omówienia wyników Autor odnosi się do postawionych zadań badawczych. W każdy z podrozdziałów omówienia wyników wskazywane są parametry procesowe stosowane w dalszych etapach pracy.

Pierwszym zadaniem było określenie warunków ekstrakcji z wybranych owoców, zastosowano zarówno wyciski jak i całe owoce. W pierwszej kolejności Autor określił warunki dla aronii czarnoowocowej. Zastosowano jako rozpuszczalnik wodę, alkohol etylowy, wodorosiarczan (IV) sodu, zakwaszoną wodę oraz kwasy fosforowy i cytrynowy. W wyniku doświadczeń wykazano, iż woda nie jest dobrym rozpuszczalnikiem w porównaniu do alkoholu etylowego. W wyniku analiz stwierdzono iż 70-owy% roztwór etanolu, 0,1% wodorosiarczan (IV) sodu są możliwe do użycia w przypadku wycisków aronii. Ponadto sprawdzono w różne rodzaje rozpuszczalników dla różnych form zastosowanego surowca wyciski, całe owoce, owoce mrożone. Ponadto dla aronii zoptymalizowano stosunek E do S oraz czas i temperaturę ekstrakcji. W wyniku analiz dla pozostałych owoców przeprowadzono ekstrakcję z użyciem kwasów fosforowego, cytrynowego oraz w przypadku bzu czarnego kwasu jabłkowego.

Do tego podrozdziału proszę o uzasadnienie – dlaczego nie wzięto do badań roztworu 50-cio %? Prezentowane wyniki pokazują iż uzyskane wartości dla 50 i 70% były zbliżone. W podrozdziale podano iż stosunek etanolu do antocyjanów „jest zbliżony do 6:1” – ile faktycznie wynosił ten stosunek? Prosiłabym także o sprecyzowanie „lekkość odpowiednia do suszenia” – według Autora jaka to lepkość? Sucha masa około 40% - dotyczyła dodatku nośnika+zawartość suchej masy ekstraktu, czy samego ekstraktu bez nośnika? Proszę sprecyzować.

Proszę także o uzasadnienie dlaczego tylko w przypadku owoców czarnego bzu zastosowano kwas jabłkowy i dla innych owoców nie było to sprawdzane, może w przypadku innych owoców uzysk byłby większy?

Pytanie do rysunku 19 – Zastanawia mnie co wpłynęło na tak szybki wzrost ekstrakcji dla temperatury 40oC przy wzroście czasu ekstrakcji z 30 do 60 minut. Proszę o uzasadnienie, w pracy nie poruszono tego zjawiska.

Kolejnym etapem badań było określenie parametrów pracy podczas chromatografii preparatywnej. Autor ponownie doświadczenia rozpoczął od analiz dla aronii czarnoowocowej. W wyniku analiz wybrano kolumnę Sepabeads SP700 i tą wykorzystywano dla kolejnych surowców. Scharakteryzowano także poszczególne parametry procesowe umożliwiające uzyskanie możliwie najwyższego stężenia antocyjanów. Niezależnie od surowca, uzyskano zadowalające wyniki przekraczające dane zawarte w standardach europejskich.

W kolejnej części pracy określone zostały warunki separacji antocyjanów z wykorzystaniem technik membranowych. W wyniku analiz wykluczono proces mikrofiltrację jako proces mogący posłużyć do rozdziału tychże składników aktywnych. Kolejne próby podjęto stosując ultrafiltrację, nanofiltrację oraz diafiltrację. Po dalszych analizach wykluczono także proces nanofiltracji, ze względu na brak uzyskania ekstraktu w proszku po suszeniu rozpyłowym. Satisfakcjonujące wyniki uzyskano po procesie diafiltracji, usunięcie cukrów prostych umożliwiło wysuszenie ekstraktu.

W kolejnym podrozdziale doktorant opisuje wyniki badań biologicznych suchych ekstraktów. Zabrakło mi przed tym podrozdziałem omówienia procesu suszenia rozpyłowego, który to pojawia się dopiero w rozdziale 9. Wyniki badań biologicznych są poprawnie przedstawione, wnioski wyciągnięte poprawnie, a rezultaty bardzo obiecujące.

W rozdziałach kolejnych Autor przechodzi do etapu badań wdrożeniowych, analizując wydajność produkcji, określając właściwości chemiczne uzyskanych wysuszonych ekstraktów oraz protokoły produkcyjne dla każdego z uzyskanych i wdrożonych ekstraktów w formie suchej.

Analizując te ostatnie rozdziały (8, 9 i 10) zabrakło mi dokładnego omówienia procesu uzyskiwania proszków wysuszonych ekstraktów, co było zawarte w zakresie badawczym w pracy „Określono także optymalne parametry procesu suszenia ekstraktów?”. W poszczególnych podrozdziałach omówienia wyników wspomniano jedynie, czy po danym procesie ekstrakcji możliwe było wysuszenie uzyskanego ekstraktu czy też nie. Autor pracy przeprowadził proces suszenia rozpyłowego, a patrząc na specyfikacje produktów zawarte w aneksie, także zostały one wprowadzone do obrotu, co świadczy o skuteczności omawianych w niniejszej pracy wdrożeń i zasadności poruszania danego tematu.

Prosiłabym o szczegółowe omówienie tego etapu badań podczas obrony. W specyfikacjach pojawia się maltodekstryna jako nośnik, w pracy nie ma o tym wzmianki ani w metodyce ani

w protokole zagęszczania i suszenia. Proszę sprecyzować w jaki sposób optymalizowany był dodatek nośnika?

W tabeli 17 pojawiają się wydajności prób produkcyjnych – skąd wartości powyżej 100%?

Proszę o uzasadnienie braku analiz statystycznych w części omówienia i dyskusji wyników.

Rozdział V pracy zawiera podsumowanie całości prac zajmujące 3 strony maszynopisu. W poszczególnych opisach Autor zawarł podsumowanie każdego z etapów badawczych i wdrożeniowych. Głównym wnioskiem kończącym jest wniosek dotyczący wdrożenia badań.

Uwagi do spisu literatury – proszę pamiętać na przyszłość, aby nazwy łacińskie pisać pochyloną czcionką.

Podsumowując ocenę merytoryczną stwierdzam, że osiągnięciem mgr Mariusza Banacha jest wdrożenie uzyskanych wyników badań w firmie Greenvit sp. z o.o., a co za tym idzie wprowadzenie na rynek wysokiej jakości produktów o określonej zawartości antocyjanów i sprawdzonych właściwościach biologicznych.

Zamieszczone w tekście oceny merytorycznej pytania/stwierdzenia mają na celu zwrócenie Autorowi uwagi na sposób przedstawiania i interpretacji wyników.

Wnioski końcowe

Recenzowana rozprawa mgr Mariusza Banacha pt: „Wykorzystanie i optymalizacja zaawansowanych technik rozdzielczych do pozyskiwania i zatężania antocyjanów, jako składnika żywności funkcjonalnej” stanowi samodzielne rozwiązanie problemu badawczego skutkującego wprowadzeniem nowego produktu na rynek.

Zadania, nakreślone w celu pracy, zostały przez Autora zrealizowane. Ponadto, Autor wykazał się umiejętnością podjęcia zadania badawczego, wychodzącego naprzeciw aktualnym trendom, przeprowadzenia eksperymentów, przeprowadzenia dyskusji naukowej i merytorycznie poprawnego wnioskowania. Zarówno rezultaty doświadczeń, jak i wynikające z nich wnioski są wartościowe i mają duże znaczenie praktyczne, o czym świadczą uzyskane i złożone patenty jak i wdrożenie wyników badań w firmie Greenvit sp. z o.o.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Mariusza Banacha odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim na stopień naukowy doktora i przedkładam do Dziekana i Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie Autora do publicznej obrony.

Emilia Janiszewska-Tordak

