

Prof. dr hab. Piotr Grzesiak
Instytut Ochrony Roślin – PIB
Zakład Metod Biologicznych i Rolnictwa Ekologicznego
ul. W. Węgorka 20
60-833 Poznań

Poznań, 17.12.2019 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Katarzyny Tyśkiewicz pt. *Zastosowanie ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym do separacji związków biologicznie aktywnych z olejów bogatych w kwasy omega-3.*

Podstawa prawna

Recenzja została wykonana na zlecenie Przewodniczącego Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauk farmaceutycznych prof. dr hab. n. farm. Dariusza Matosiuka Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny w Lublinie - pismo DN.K./7210/197/2019 z 18.11.2019r.

Informacje ogólne

Katarzyna Tyśkiewicz ukończyła w 2013 roku studia wyższe na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, uzyskując stopień magistra chemii. Praca magisterska pt. *Opracowanie preparatyki pasty do zębów z konserwantami naturalnymi* została wykonana w Zakładzie Chemii Ogólnej i Koordynacyjnej. Promotorem była dr hab. Zofia Rzączyńska, prof. UMCS. Będąc na studiach ukończyła licencjat w Nauczycielskim Kolegium Języków Obcych w Puławach w zakresie nauczanie języka angielskiego. W 2015 roku została zatrudniona w Zakładzie Ekstrakcji Nadkrytycznej Instytutu Nowych Syntez Chemicznych w Puławach na stanowisku chemika, w 2018 roku na stanowisku specjalisty inżynieryjno-technicznego, a od 2019 roku na stanowisku asystenta. Od 01.2019 roku pełniła obowiązki Zastępcy Kierownika Zakładu Ekstrakcji Nadkrytycznej INS w Puławach, a od 04.2019 roku jest Zastępcą Kierownika tego Zakładu.

Ocena pracy doktorskiej

Praca doktorska mgr Katarzyny Tyśkiewicz została wykonana w Samodzielnej Pracowni Chemii Produktów Pochodzenia Naturalnego Katedry i Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu

Medycznego w Lublinie oraz w Zakładzie Ekstrakcji Nadkrytycznej Instytutu Nowych Syntezy Chemicznych w Puławach. Promotorami pracy byli dr hab. inż. Edward Rój, prof. nadzw. INS oraz dr hab. n. farm. Krystyna Skalicka-Woźniak, prof. nadzw. UM.

Praca doktorska pt. *Zastosowanie ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym do separacji związków biologicznie aktywnych z olejów bogatych w kwasy omega-3* stanowi monotematyczny cykl 5 publikacji w czasopismach z listy JCR i 1 zgłoszenie patentowe. We wszystkich wymienionych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Oprócz tego Doktorantka prezentowała wyniki badań na 3 konferencjach naukowych. Praca doktorska zawiera autoreferat liczący 147 stron, 12 rysunków oraz 92 cytowane pozycje literaturowe. Część ta została podzielona na XIII rozdziałów zawierających wstęp, tezy naukowe pracy, część teoretyczną, cel pracy doktorskiej, omówienie wyników, podsumowanie i wnioski oraz literaturę. Autoreferat zawiera także życiorys naukowy, streszczenia rozprawy doktorskiej, wykaz publikacji wchodzących w skład pracy oraz oświadczenia współautorów i wykaz stosowanych skrótów. W części teoretycznej Doktorantka omówiła w sposób szczegółowy ekstrakcję i chromatografię płynem w stanie nadkrytycznym, dokonała charakterystyki badanych materiałów i związków bioaktywnych w badanych materiałach (witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, kwasy tłuszczowe oraz sterole roślinne).

Ocenę pracy doktorskiej pod względem formalnym, edytorskim i językowym dokonali recenzenci poszczególnych czasopism.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Tytuł pracy doktorskiej odpowiada zakresowi prowadzonych badań. Cel i zakres badań zostały jednoznacznie zdefiniowane. Celem było zastosowanie CO₂ w stanie nadkrytycznym do izolacji, frakcjonowania i separacji związków biologicznie aktywnych z materiałów bogatych w kwasy omega-3, jednostopniowej separacji witamin rozpuszczalnych w tłuszczach oraz opracowanie metody separacji fukosterolu z brązowych alg. Jako materiał do badań zastosowano odpadowy olej rybny oraz surowiec odnawialny tzn. plechę morskoczynu pęcherzykowatego (*Fucus vesiculosus* L.). Doktorantka dokonała bardzo ważnego i trafnego wyboru surowca do badań, zgodnie z obowiązującym ustawodawstwem w tym zakresie i zasadą zrównoważonego rozwoju. Przy wyborze surowców kierowano się brakiem dostatecznej ilości badań nad ich składem chemicznym oraz brakiem efektywnych metod separacyjnych fukosterolu i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Dla realizacji postawionych celów Doktorantka zastosowała nowoczesne metody izolacji i frakcjonowania związków biologicznie aktywnych (SFE; CC-SFE), a także metodę separacji płynem w stanie nadkrytycznym (SFC). Opracowała nowatorskie

metody analityczne do oznaczania związków bioaktywnych rozpuszczalnych w tłuszczach oraz fukosterolu - należy podkreślić oryginalność metodyczną badań. Jednym z bardzo ważnych celów było wykazanie, czy ekstrakt nadkrytyczny z makroglonów może stanowić biologiczny dodatek do preparatów ochrony roślin przed metabolitami fitopatogenicznych grzybów.

Doktorantka przebadła możliwość separacji kwasów tłuszczowych z odpadowego oleju rybnego z wykorzystaniem przeciwprądowej ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym wraz z optymalizacją przebiegu procesu. Dotychczas metoda ta była stosowana jedynie do separacji oleju rybnego o zawartości kwasów EPA i DHA powyżej 60%. Dlatego Doktorantka podjęła badania nad separacją oleju o bogatym składzie jakościowym i ilościowym pod względem kwasów tłuszczowych [Załącznik III]. Przebadła wpływ temperatury (60°C) oraz ciśnienia (150, 200 bar) na skład ekstraktu. Badania prowadziła dla pierwszego stopnia separacji (80, 100 i 120 bar) oraz dla drugiego stopnia separacji przy około 52 bar, dokonując analizy chemicznej oleju rybnego po derywatywacji. Stwierdziła znaczny wpływ badanych parametrów na rozpuszczalność nasyconych kwasów tłuszczowych w ditlenku węgla, zawartość których ulegała nawet kilkukrotnemu zwiększeniu, a także zmiany zawartości kwasów PUFA w porównaniu do zawartości wyjściowej. Potwierdziła tym samym możliwość stosowania ditlenku węgla do separacji i modyfikacji składu odpadowego oleju rybnego. Ponieważ skład jakościowy i ilościowy tego oleju nie był przebadany pod kątem witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, dlatego szczególną uwagę Doktorantka poświęciła optymalizacji procesu i zastosowaniu chromatografii płynem w stanie nadkrytycznym (SFC) do separacji witamin (A, D, E i K) rozpuszczalnych w tłuszczach oraz opracowaniu nowej, oryginalnej metody oznaczania witamin w jednym eksperymencie. Dotychczas witaminy te oznaczano osobno [Załącznik I]. Wykazała, że dodatek metanolu do fazy ruchomej oraz temperatura kolumny mają duży wpływ na utrzymanie fazy ruchomej w stanie nadkrytycznym przy zoptymalizowanych parametrach przebiegu procesu [Załącznik II]. Wykazała przydatność CO₂ w stanie nadkrytycznym do separacji tych witamin, co pozwoliło opracować oryginalną metodę analityczną. Doktorantka przebadła także możliwość zastosowania ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym do separacji/izolacji frakcji związków biologicznie aktywnych z surowca roślinnego zawierającego kwasy omega-3. Ponieważ dokładne określenie zawartości fukosterolu w ekstrakcie nadkrytycznym z *F. vesiculosus* nie było możliwe z powodów metodycznych, dlatego Doktorantka opracowała nowatorską metodę oznaczania fukosterolu w ekstrakcie nadkrytycznym z morskoczynu pęcherzykowatego w systemie chromatografii płynem w stanie nadkrytycznym (SFC) [Załącznik IV]. Badania wykazały, że plecha *F. vesiculosus* charakteryzowała się stosunkowo wysoką zawartością fukosterolu (80,58 mg/g ekstraktu) w porównaniu z jego zawartością w innych gatunkach brązowych alg. Opracowanie metody

analitycznej oznaczania fukosterolu, jak i oznaczenie samego związku w ekstrakcie nadkrytycznym z morszczyzny pęcherzykowatego były nowatorskie. Doktorantka przebadła możliwość zastosowania ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym do pozyskania frakcji związków bioaktywnych z *F. vesiculosus* i określiła właściwości przeciwgrzybiczne przeciwko patogenom *Fusarium*, odpowiedzialnym za jedną z najczęstszych chorób roślin, jaką jest fuzarioza. Stosowane w ochronie roślin preparaty chemiczne negatywnie oddziałują na środowisko, także między innymi z powodu uodparnianie się fitopatogenów. Doktorantka wykazała, że ekstrakt nadkrytyczny z *F. vesiculosus* hamuje wzrost badanych grzybów i hamuje kiełkowanie makrokonidii fitopatogenów [Załącznik V], a działanie można częściowo przypisać fukosterolowi, dla którego także określiła działanie przeciwgrzybiczne przeciwko fitopatogenom *Fusarium* spp. Doktorantka wykazała, że silne przeciwgrzybiczne działanie ekstraktu z *F. vesiculosus* jest spowodowane zahamowaniem wzrostu i rozwoju fitopatogenicznych grzybów *F. culmorum* i *F. oxysporum*. Opracowanie preparatów na bazie ekstraktów glonowych jest właściwym kierunkiem poszukiwań ponieważ ekstrakty glonów uzyskane alternatywną metodą ekstrakcji w stanie nadkrytycznym nie niosą żadnego ryzyka dla zdrowia człowieka ani środowiska. Badania potwierdziły także, że ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym może być stosowany do separacji frakcji wzbogaconej w związki biologicznie aktywne, zwłaszcza o właściwościach przeciwgrzybiczych, a ekstrakt może stanowić potencjalny dodatek biologiczny do środków ochrony roślin. Sposób pozyskiwania ekstraktu z morszczyzny pęcherzykowatego o właściwościach przeciwgrzybiczych został zgłoszony do opatentowania [Załącznik VI].

Chciałbym podkreślić, że postawione cele zostały osiągnięte. Doktorantka wykazała możliwość zastosowania ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym zarówno do izolacji, frakcjonowania oraz separacji związków biologicznie aktywnych z materiałów bogatych w kwasy omega-3, jednoetapowej separacji substancji lipofilowych z grupy witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E i K) oraz separacji fukosterolu z brązowych alg. Chciałbym także podkreślić, że wnioski końcowe odpowiadają uzyskanym wynikom badań i zostały poprawnie sformułowane.

Zainteresowanie związkami pochodzenia naturalnego jest coraz większe, chociaż na rynku dominują produkty syntetyczne lub naturalne wytwarzane z użyciem metod ekstrakcji cieczerwowej. Pozyskiwanie naturalnych związków z różnych surowców jest właściwą drogą, pod warunkiem opracowania skutecznej i selektywnej techniki ekstrakcji zapewniającej ich czystość, trwałość i stabilność chemiczną. Technologia ekstrakcji ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym eliminuje wady tradycyjnej ekstrakcji z użyciem rozpuszczalników organicznych

Za najważniejsze w recenzowanej pracy doktorskiej uznaje następujące, oryginalne i nowatorskie rozwiązania, a mianowicie:

- Zastosowanie metody CC-SFE do separacji kwasów tłuszczowych z odpadowego oleju rybnego.
- Opracowanie nowej metody oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E i K) w jednym eksperymencie.
- Opracowanie metody oznaczania fukosterolu i rozpoznanie właściwości przeciwgrzybicznego ekstraktu nadkrytycznego z *F. vesiculosus*.

Oceniając pracę doktorską należy podkreślić, że uzyskane wyniki badań są zgodne z zasadą zrównoważonego rozwoju i priorytetami Europejskiej Platformy Technologicznej Zrównoważonej Chemii poprzez zapewnienie czystości otrzymywanych ekstraktów oraz stałych pozostałości po ekstrakcji. Kierunek ich zastosowania został wskazany, ale mogą znaleźć się także inne zastosowania. Technologia jest prawnie chroniona. Pozwoli to uzyskać wymierne efekty w przypadku jej wdrożenia i zwiększy konkurencyjność produktu.

Wydaje się celowym wskazanie przez Doktorantkę możliwości i uwarunkowań pozwalających na wdrożenie wyników badań, określenia skali przedsięwzięcia oraz zdefiniowanie ścieżki wdrożenia ekstraktu nadkrytycznego z *F. vesiculosus* do ochrony roślin.

Ocena dorobku naukowego

Doktorantka ma bardzo duży dorobek naukowy przy krótkim stażu pracy. Wyniki badań stanowiące rozprawę doktorską zostały opublikowane w czasopiśmie z listy JCR o zasięgu krajowym (Przemysł Chemiczny) i międzynarodowym (Journal of Separation Science, Molecules). Sumaryczny IF wynosi 9,49, natomiast suma punktów MNiSW wynosi 120. Wyniki badań były prezentowane na konferencjach naukowych. Doktorantka była wykonawcą/kierownikiem kilku projektów badawczych.

Łączny dorobek mgr Katarzyna Tyśkiewicz obejmuje 11 publikacji w czasopiśmie z listy JCR, 1 rozdział w monografii anglojęzycznej, 18 prezentacji wyników na międzynarodowych konferencjach naukowych i 4 na konferencjach krajowych oraz 2 zgłoszenia patentowe. Łączny IF jest wysoki i wynosi 25,13, indeks Hirsha wynosi 2 natomiast liczba punktów MNiSW 295. Liczba cytowań według bazy WoS wynosi 20, bez autocytowań 18.

4. Podsumowanie i wnioski końcowe

W pracy doktorskiej przedstawiono wyniki badań prowadzonych w okresie 2018-2019 r. W skład cyklu publikacji wchodzi artykuł przeglądowy, w którym przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach i wodzie metodą

*chromatografii w stanie nadkrytycznym, cztery oryginalne artykuły naukowe oraz jedno zgłoszenie patentowe zawierające sposób pozyskiwania ekstraktu z *F. vesiculosus* o właściwościach przeciwgrzybiczych.*

*Pod względem merytorycznym pracę doktorską mgr Katarzyny Tyśkiewicz oceniam bardzo wysoko. Cele zostały prawidłowo zdefiniowane i osiągnięte. Materiał do badań został prawidłowo dobrany. Stanowił on odpadowy olej rybny oraz morskocyn pęcherzykowaty jako surowiec odnawialny, zgodnie z obowiązującym ustawodawstwem i zasadą zrównoważonego rozwoju. Doktorantka wykazała możliwości zastosowania ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym do izolacji i frakcjonowania związków biologicznie aktywnych z materiałów bogatych w kwasy omega-3 oraz opracowała oryginalne metody separacji i oznaczania związków bioaktywnych, co jest istotną nowością pracy. Bardzo ważnym efektem i zarazem nowością badań było potwierdzenie możliwości wykorzystania ekstraktu z morskocynu pęcherzykowatego do zwalczania fitopatogenów z rodzaju *Fusarium* spp.*

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Tyśkiewicz spełnia wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 roku *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki* (Dz. U. nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami. Mgr Katarzyna Tyśkiewicz posiada umiejętność prowadzenia badań naukowych oraz właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Popieram wnioski do Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauk farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie o dopuszczenie mgr Katarzyny Tyśkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom pracy doktorskiej, rangę rozwiązanego zagadnienia, jakość i zakres przeprowadzonych badań, oryginalność i nowatorski charakter zastosowanych metod badawczych, duże walory poznawcze i zdefiniowany charakter wdrożeniowy wyników badań, a także bardzo duży dorobek naukowy Doktorantki wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauk farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Katarzyny Tyśkiewicz.

Wojciech Ryszard