

dr hab. Marek Gancarz, prof. URK
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki
Katedra Inżynierii Bioprocessów, Energetyki i Automatykacji
ul. Balicka 116 B
30-149 Kraków

Kraków, 10.04.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Andrzeja Kwaśnicy pt. „Opracowanie procedur określania pochodzenia materiału roślinnego metodami chromatograficznymi i genetycznymi”

Promotor rozprawy: prof. dr hab. inż. Antoni Szumny
Opiekun pomocniczy: dr n. med. Agnieszka Pilecka

**Praca doktorska zrealizowana w ramach II edycji programu „Doktorat Wdrożeniowy”
finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego**

Podstawa formalna wykonania recenzji

Recenzję wykonano na podstawie pisma Przewodniczącej Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, prof. dr hab. Agnieszki Kita z dnia 14.02.2024 roku.

Uwagi ogólne

Rozprawa doktorska mgr inż. Andrzeja Kwaśnicy ma układ poprawny. Składa się z 10. rozdziałów głównych i 11. podrozdziałów, które zawierają kolejne 12 podrozdziałów. Z uwagi na interdyscyplinarność badanego problemu tak duża liczba rozdziałów i podrozdziałów jest uzasadniona. W rozdziale PRZEGLĄD LITERATURY Doktorant omawia kwestie obrotu oraz posiadania a także przetwarzania materiałów roślinnych, co reguluje w Polsce kilka aktów prawnych, a Doktorant podaje najważniejszy z nich czyli Ustawę o Przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 29 lipca 2005r. Ustawa ta z jednej strony zawiera odwołanie do Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie wykazu środków odurzających, substancji psychotropowych oraz nowych substancji psychoaktywnych z dnia 17 sierpnia 2018r., które to rozporządzenie wymienia enumeratywnie substancje, których posiadanie jest zabronione, a z drugiej strony definiuje co należy rozumieć pod pojęciem przetwarzania, wytwarzania i przerobu środków odurzających. W odniesieniu do roślin konopi definiuje nie tylko samo pojęcie ziela konopi czy żywicy konopi, ale również podaje kryterium klasyfikacji ziela konopi do jednej z dwóch grup: ziela konopi włóknistych oraz ziela konopi innych niż włókniste. Tym kryterium w przypadku ziela konopi jest

łączna zawartość Δ -9-tetrahydrokannabinolu oraz kwasu Δ -9-THC-2-karboksyowego w suchej masie ziela, natomiast w przypadku żywicy konopi istotna jest sama obecność Δ -9-tetrahydrokannabinolu lub kwasu Δ -9-THC-2-karboksyowego. Wymienia także powiązane rozporządzenia i Ustawy mający ścisły związek z tematyką pracy tj.: Rozporządzenie Ministra zdrowia w sprawie wykazu środków odurzających, substancji psychotropowych i nowych substancji psychoaktywnych (Dz.U.2022.poz. 1665); Ustawa z dnia 6 grudnia 2008r. o wyrobach akcyzowych (Dz.U. 2023. poz. 1542); Ustawa Prawo Farmaceutyczne (Dz.U.2921 poz.1977); Ustawa o podatku akcyzowym z dnia 6 grudnia 2008r. (Dz.U.2023 poz. 1542); Ustawa o ochronie zdrowia przed następstwami używania tytoniu i wyrobów tytoniowych z dnia 9 listopada 1995r. (Dz.U.2023 poz. 700). Całość opracowania liczy łącznie 185 stron w tym 140 stron w tekście głównym wraz z publikacjami i w nim zawiera 41 tabel oraz 33 prezentacji graficznych, w tym 13 rysunków przedstawiających wyniki badań zawarte w 3. publikacjach. Część eksperymentalną pracy zamyka rozdział WYNIKI OPUBLIKOWANE zawarte we wspomnianych 3. publikacjach oraz WYNIKI NIEOPUBLIKOWANE i ich dyskusja oraz 9 wniosków z przeprowadzonych analiz. Literatura obejmuje 76 pozycji, z czego większość to pozycje obcojęzyczne pochodzące z ostatnich lat.

Ocena merytoryczna pracy

Rozprawa doktorska mgr inż. Andrzeja Kwaśnicy napisana została zrozumiałym i poprawnym językiem i pomimo pewnej ilości uchybień edytorskich, od strony formalnej nie budzi większych zastrzeżeń. Należy uznać, że jest przejrzysta i przedstawia wartościowy wkład naukowy, uzupełniający wiedzę w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Interdyscyplinarny charakter eksperymentu oraz zakres prac badawczych wymusza od Autora przeprowadzenia wielowątkowego przeglądu literatury. W pierwszym podrozdziale II.1 przedstawia obecny stan prawny w Polsce w kontekście roślin i kwestie obrotu oraz posiadania a także przetwarzania materiałów roślinnych. Ponadto, wymienia wiele substancji chemicznych będących metabolitami wtórnymi produkowanymi przez liczne gatunki roślin.

W podrozdziale II.2 omawia Chemizm najważniejszych roślin. Zestawia najważniejsze metabolity wtórne roślin podlegających prawnej kontroli. Dodał też nieujęte wprost w Ustawie o przeciwdziałaniu narkomanii tzw. grzyby halucynogenne – tj. grzyby z rodzaju Psilocybe, których głównym, psychoaktywnym metabolitem wtórnym są psylocybina i psylocyna – substancje psychotropowe z grupy I P w rozumieniu Rozporządzenia Ministra Zdrowia.

W kolejnym podrozdziale II.3 przedstawia sposoby określania pochodzenia roślin bazując na jedynym, pozostającym w powszechnym użyciu, sposobem identyfikacji materiałów roślinnych wykorzystywanym w kryminalistyce, którym jest identyfikacja na podstawie makro i mikroskopowych cech budowy morfologicznej.

W podrozdziale II.4 dokonuje szerokiej charakterystyki wpływu suszenia roślin na profil metabolitów wtórnych. Wymienia najważniejsze czyli: suszenie konwekcyjne (statyczne, rozpyłowe, z wykorzystaniem energii słonecznej itp.); suszenie mikrofalowe i na koniec liofilizację. Podaje w nim również ograniczenia każdej z tych technik a także jak każda technika wpływa na suszony materiał.

W ostatnim podrozdziale II.5 dokonuje przeglądu metod analitycznych stosowanych w analizie materiałów roślinnych, wśród których przedstawia najczęściej wykorzystywane techniki podziałowe takie jak chromatografia gazowa (GC) i chromatografia cieczowa (LC) oraz sprzężenia tych technik ze spektrometrią mas (MS). Podrozdział ten dzieli na kolejne 5 podrozdziałów.

W pierwszym podrozdziale II.5.1 przedstawia chromatografię gazową (GC) wymieniając jej ograniczenia przede wszystkim lotnością analitów. Wyjaśnia jednak, że chromatografia gazowa (GC) w sprzężeniu ze spektrometrią mas (MS) daje jednak unikalną możliwość identyfikacji substancji z wykorzystaniem baz danych na podstawie czasu (indeksu) retencji i widma fragmentacyjnego.

W podrozdziale II.5.2 opisuje Chromatografię cieczową (LC), która to technika nie posiada ograniczeń, co do lotności analitów, tak jak w przypadku chromatografii gazowej (GC), co powoduje, że jej zakres stosowalności jest znacznie większy. Ograniczeniem w przypadku zastosowania tej metody jest rozpuszczalność danej substancji w zastosowanej fazie ruchomej. Niestety możliwości identyfikacji substancji na podstawie danych z analizatora mas w przypadku techniki sprzężonej są w porównaniu do GC/MS znacznie mniejsze.

W kolejnym podrozdziale II.5.3 przytacza informacje o chromatografii cienkowarstwowej (TLC), która jest jedną z najstarszych metod chromatograficznych. Przedstawia ją jako uproszczoną wersję chromatografii cieczowej, gdzie rolę pompy dozującej fazę ruchomą pełnią siły kapilarne a detekcja odbywa się z użycie światła UV i/lub na drodze chemicznej. Mimo swej prostoty, technika jest ciągle stosowana. Słusznie zauważa, że wszędzie tam, gdzie nie ma potrzeby używania bardzo czułych metod oraz gdzie celem analizy jest półilościowe, proste, szybkie i przede wszystkim tanie określenie tożsamości (na drodze porównania z wzorcem) czy wychwycenie zmian w składzie próby, technika ta okazuje się być dobrym rozwiązaniem.

W przedostatnim podrozdziale II.5.4 charakteryzuje wady i zalety spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), który nie jest techniką podziałową i nie wymaga skomplikowanego procesu przygotowania próby, a co za tym idzie, pomiar tą techniką jest szybki. Niestety jak zauważa, technika ta charakteryzuje się stosunkowo niską czułością ponieważ przy stężeniu analitów na poziomie poniżej 1% (w analizowanej próbce)

analiza zazwyczaj jest już niemożliwa ze względu na wysoki udział tła, a to sprawia, że jest obciążona dużym błędem przez integrację protonów, szczególnie jeśli dodatkowo matrycę stanowi skomplikowana mieszanina substancji o podobnej budowie – jak np. ekstrakt roślinny. Kolejną ogromną wadą tej techniki jak podaje Doktorant jest również wysoki koszt zakupu aparatury oraz koszt jej utrzymania. Przedstawia i słusznie zresztą także zaletę, którą jest jej szybkość, prostota przygotowania próby oraz możliwość uzyskania ilościowego wyniku bez konieczności stosowania wzorca fizycznego. Słusznie zauważa, że jest to wyjątkowa zaleta stosowania tej techniki.

W ostatnim podrozdziale II.5.5 przedstawia wady i zalety innych technik analitycznych. Zalicza do nich testy barwne, które umożliwiają szybką analizę materiałów pod kątem obecności pewnych klas związków organicznych. Słusznie podaje, że jest to technika powszechnie stosowana do szybkiej, możliwej do przeprowadzenia nawet w warunkach polowych, identyfikacji - np. popularnych narkotyków (amfetamina, kokaina, heroina) czy materiałów pochodzących z konopi.

Wymienia też technikę znacznie bardziej specyficzną a jednocześnie szybką i bardzo selektywną jaką jest spektrometria ruchliwości jonów (IMS), która jest szybką techniką mającą zastosowanie do wykrywania śladów substancji organicznych m.in. do wykrywania śladów narkotyków (w tym i kannabinoidów) w warunkach polowych – np. na lotniskach. Jednak wadą tej metody jest możliwość nasycenia detektora co skutkuje wyłączeniem urządzenia z ruchu. Zważywszy, że aparaty reagują na bardzo niewielkie stężenia, dłuższy kontakt ze stężonymi próbkami, lub analiza dużej liczby prób jest bardzo problematyczna. Zauważa też, że w chwili obecnej nie opracowano lepszej metody jednoczesnego rozdzielenia i identyfikacji składników mieszanin, tak szybkiej, czulej i możliwej do zastosowania poza warunkami laboratoryjnymi.

Wysiłki Doktorant skupił przede wszystkim na konopiach jako na roślinie pokrywającej ponad 99% wszystkich tego rodzaju analiz w praktyce Lab4Tox sp. z o.o., jednakże wypracowane w ramach prowadzonego projektu narzędzia i metody planuje się wykorzystać również w przypadku innych, pozostających w zainteresowaniu roślin.

Należy zauważyć wzrost zapotrzebowania na prowadzenie takich badań, które umożliwiają określenia podobieństwa badanych próbek konopi czy wskazanie na źródło ich pochodzenia – a takie oczekiwania zleceniodawców. Należy również podkreślić, że żadne znane laboratorium nie prowadzi rutynowo takich badań. Wobec tak zidentyfikowanej potrzeby rynkowej bardzo trafnym, w mojej opinii jest wybór zakresu badawczego podjętego przez Doktoranta, aby uzupełnić możliwości badawcze firmy Lab4Tox. Sp. z o.o. w ramach realizowanej pracy doktorskiej.

Jako kluczowy problem badawczy Doktorant wytypował identyfikację zmian jakościowych i ilościowych wybranych metabolitów wtórnych zachodzących w trakcie procesu suszenia i przechowywania materiału konopnego. Oznaczenie zmian markerowych metabolitów, tj. związków lotnych, fitosteroli oraz kannabinoidów może dostarczyć informacji na temat ich stabilności w czasie, a w konsekwencji umożliwić w przyszłości stworzenie charakterystyki próbkowanych materiałów. Prace te prowadzono pod kątem optymalizacji wykorzystania dostępnego w firmie Lab4Tox chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym. W prowadzonych pracach Doktorant skupił się na użyciu metod z obszaru chemii analitycznej.

W oparciu o powyższe zagadnienia mgr inż. Andrzej Kwaśnica wyznaczył główny cel pracy w ramach realizowanego doktoratu wdrożeniowego, którym było opracowanie metod analizy materiałów roślinnych oraz produktów pochodzenia roślinnego umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację.

Celem prac było również opracowanie metody analizy konopi z wykorzystaniem narzędzi analizy materiału genetycznego. Wytypował tu technikę analizy sekwencji mikrosatelitarnych (STR) jako potencjalnie dającą największe szanse na realizację celu. Na podstawie publikacji ustalił sekwencje STR, które w założeniu dawały możliwość zróżnicowania roślin w obrębie tej samej odmiany.

Kolejnym celem prowadzonych prac przez Doktoranta było opracowanie metody umożliwiającej porównanie próbek materiału roślinnego z sobą czy wskazanie źródła pochodzenia danej próbki, ponieważ możliwość wykonania tego rodzaju analiz dawałaby szansę rozstrzygnięcia kwestii tożsamości materiałów roślinnych, co z punktu widzenia prawa ma w niektórych sytuacjach kluczowe znaczenie.

Praca doktorska mgr inż. Andrzeja Kwaśnicy obejmuje szeroko zakrojony zakres badawczy, który z jednej strony wymaga znajomości technik analiz chemicznych, fizycznych czy genetycznych i zawiera interesujące aspekty badawcze, dotyczące identyfikacji zmian jakościowych i ilościowych wybranych metabolitów wtórnych zachodzących w trakcie procesu suszenia i przechowywania materiału konopnego. Wszystkie te aspekty powodują, że podjęty przez mgr inż. Andrzeja Kwaśnicę w rozprawie doktorskiej temat ważny jest nie tylko z punktu widzenia rozwiązania nowego problemu badawczego, ale staje się istotnym zagadnieniem, nadającym pracy aplikacyjny charakter.

Proces suszenia odgrywa kluczową rolę w zachowaniu aromatu, a także jakości produktów. W pierwszym etapie prac Doktorant wykonał badania kwiatów konopi (*Cannabis sativa* L.), które mają szerokie zastosowanie w kosmetyce, żywności i przemyśle farmaceutycznym., a wyniki są przedstawione w opublikowanej pracy w czasopiśmie *Foods* o wysokim IF pt. „Volatile composition and sensory properties as quality attributes of fresh and dried hemp flowers

(*Cannabis sativa* L.)”, w której Doktorant jest pierwszym autorem i jest również jednym z autorów korespondencyjnych. W badaniu sprawdził siedem wariantów suszenia kwiatów konopi, obejmujących suszenie konwekcyjne, suszenie próżniowo-mikrofalowe oraz suszenie kombinowane składające się z wstępnego suszenia konwekcyjnego, a następnie końcowego suszenia próżniowo-mikrofalowego. Dla każdego procesu zastosował model dwutermiowy. Wysuszony materiał poddał ocenie barwy i analizie chromatograficznej. Po analizie otrzymanego olejku eterycznego wykazał obecność 93 związków lotnych, głównie β -mircenu, limonenu i β -(E)-kariofilenu, a także α -humulenu. Zastosowanie przez Doktoranta mocy 240W podczas suszenie próżniowo-mikrofalowego i 50°C podczas suszenie konwekcyjne pozwoliło na otrzymanie największej retencji związków aromatycznych, wynoszącą odpowiednio 85 i 76%, ale przy ogromnych zmianach barwy. Dodatkowo wykonana przez Doktoranta analiza sensoryczna wykazała, że suszenie mocą mikrofal 240W pozwala otrzymać produkt najbardziej zbliżony do świeżego surowca. *Czy Doktorant wykonywał też badania dla niższych mocy? W publikacji są jeszcze wyszczególnione badania dla wyższych wartości od 240W. Być może niższa moc od 240W dawałaby produkt jeszcze bardziej zbliżony do świeżego surowca?*

Nierafinowane oleje roślinne z niszowych nasion oleistych są obecnie poszukiwane przez konsumentów ze względu na ich wyjątkowe właściwości odżywcze i walory smakowe. Dużym problemem jest intensywność koloru i smaku olejków niszowych, a ich rafinacja nie jest możliwa na skalę przemysłową ze względu na małą skalę produkcji. Celem podjętych badań w dalszym etapie pracy Doktoranta była analiza wpływu zmiany zawartości fitosteroli po procesie wybielania olejów konopnych odmiany Finola, Earlina 8FC i Secuieni Jubileu. Wyniki opublikował będąc pierwszym autorem w czasopiśmie *Molecules*, które również posiada wysoki IF, pt. „Analysis of Changes in the Amount of Phytosterols after the Bleaching Process of Hemp Oils”. Oleje roślinne tłoczone na zimno i na gorąco bielił ziemią bielącą w dwóch stężeniach. Ziemię bielącą poprocesową ekstrahował metanolem. Zawartość fitosteroli w surowych olejach i ekstrakcie po przemyciu ziemią bielącą metanolem analizował metodą chromatografii gazowej. Z przeprowadzonych badań wywnioskował, że proces bielenia nie wpłynął znacząco na ubytek fitosteroli w olejach. Dowiódł, że śladowe ilości fitosteroli pozostały też na ziemi bielącej i dzięki ekstrakcji metanolem można je wyekstrahować z oleju. Wywnioskował z przeprowadzonych badań, że bielenie oleju konopnego nie powoduje jego wyczerpania, a znacząco poprawia właściwości organoleptyczne. Drugim wnioskiem jaki podał jest to, że proces bielenia oleju powoduje utratę oleju mniejszą niż 2% wagowych bielonego oleju, przy czym strata zależy od rodzaju użytej ziemi bielącej. Z przeprowadzonych badań wywnioskował także, że utrata fitosteroli po procesie bielenia wynosi średnio $2,69 \pm 0,69\%$ i zależy od rodzaju zastosowanej ziemi bielącej oraz oleju ekstrahowanego z różnych odmian nasion konopi.

Konopie są wykorzystywane jako źródło błonnika, oleju i substancji bioaktywnych, w tym substancji lotnych i zawierających kannabinoidy. W kolejnym kroku Doktorant jako pierwszy przedstawia wyniki oceny metod suszenia (konwekcyjnego, próżniowo-mikrofalowego i kombinowanego konwekcyjnego suszenia wstępnego oraz próżniowo-mikrofalowego suszenia końcowego) liści konopi na zmiany jakościowe i ilościowe metabolitów wtórnych, w tym oleje, kannabinoidy i sterole. Przeprowadza także test rankingowy i opisowy liści konopi. Kinetykę suszenia przedstawia za pomocą trzech modeli: logarytmicznego, Midilli i zmodyfikowanego Page'a, a wyniki publikuje jako pierwszy autor oraz jeden z autorów korespondencyjnych również w czasopiśmie *Molecules* tytułując pracę „Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory Properties of Cannabis sativa Leaves”. Za pomocą techniki SPME-Arrow oznacza w badaniach 41 związków lotnych, z których w liściach suszonych i świeżych dominowały kariofilen, β -myrcen i α -humulen. Spośród otrzymanych olejków eterycznych zidentyfikował 64 związki, z których dominował kariofilen, epoksyd humulenu II i limonen. Jak wykazał w trakcie badań do konserwacji jak największej ilości olejów najlepszą metodą było wstępne suszenie konwekcyjne, a następnie łączone suszenie próżniowo-mikrofalowe w 60°C, w którym retencja związków lotnych wyniosła 36,08%, natomiast metodami: suszenie konwekcyjne w 70°C i mocy 240W podczas suszenie próżniowo-mikrofalowego spowodował największą stratę związków lotnych wynoszącą aż 83%. Dominującymi kannabinoidami które uzyskał ze świeżych liściach konopi były CBDA 6,05 i CBD 2,19 mg g⁻¹. Wywnioskował, że suszenie nie spowodowało zmian w profilu kannabinoidowym materiału roślinnego. Wykazał, że we frakcji fitosterolowej i triterpenowej dominowały β -sitosterol, kampesterol i lupeol. W żadnym z wariantów nie zaobserwował zmian jakościowych ani ilościowych. *Tutaj mam kolejne pytanie. W poprzedniej pracy Doktoranta opublikowanej w Foods wykonana przez Doktoranta analiza sensoryczna wykazała, że suszenie mocą mikrofal 240W pozwala otrzymać produkt najbardziej zbliżony do świeżego surowca, to tej powyżej Doktorant podaje, że „suszenie konwekcyjne w 70°C i mocy 240W podczas suszenie próżniowo-mikrofalowego spowodował największą stratę związków lotnych wynoszącą aż 83%? Czy przy suszeniu z mocą mikrofal 240W wszystkie związki są najbardziej zbliżone ze świeżym surowcem czy tylko niektóre?*

W dalszej części badań i przedstawionych jako badania nieopublikowane, Doktorant wykonuje analizy profilu kannabinoidów konopi w próbkach z lat 2018-2022. Próbki zebrano, a następnie poddano analizie statystycznej dotyczącej zawartości pięciu głównych (tj. THC, CBD, CBG, CBC) kannabinoidów zebrane w trakcie pomiarów próbek komercyjnych pochodzące z upraw prowadzonych w Polsce, w trzech ostatnich lat działalności operacyjnej firmy. Pomiaru wykonał techniką GC-MS. Do oznaczenia fitokannabinoidów wykorzystał metodę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Przeanalizował próbki materiałów roślinnych

pochodzących z odmiany Futura, Santhica, Finola i Carmagnola. Łącznie przeanalizowa dane dla 105 próbek suszu. Doktorant stwierdził, że istnieje istotna statystycznie różnica między grupami pod względem zawartości poszczególnych kannabinoidów. Dla Carmagnoli wykazał w tych latach największą zawartość THC, CBD oraz CBC w porównaniu do innych odmian. Najniższe stężenie THC uzyskał dla Santhici, przy czym jak podał, jest ona typową odmianą CBG charakteryzującą się niskim równoczesnym stężeniem CBD. Odmiany Futura i Finola stwierdził, że są podobne pod względem zawartości CBD i CBC. Nie wykazał, by któraś z analizowanych odmian charakteryzowała się profilem kannabinoidowym na tyle charakterystycznym by jednoznacznie wskazywał on na konkretną odmianę. Wyraźnie zauważył znaczne zróżnicowanie zawartości kannabinoidów nie tylko pomiędzy odmianami, ale i w ramach jednej odmiany. *Ogromny wpływ na wyniki miały z pewnością warunki uprawy i wzrostu roślin. Czy Doktorant przeanalizował sposób i warunki uprawy i wzrostu tych odmian w badanym okresie?*

W dalszej części prac przedstawionych w rozdziale Autor zbadał wpływ użytego rozpuszczalnika organicznego na profil metabolitów wtórnych ekstraktów suchych z kwiatostanu konopi włóknistej *Cannabis sativa*. Do badań wykorzystał specjalnie przygotowaną mieszankę dwóch odmian konopi siewnej uprawianych w 2021 r. na terenie Polski: Finola i Santhica w stosunku 4:1. Zastosowanie mieszaniny dwóch odmian konopi miało na celu zwiększenie zawartości cennego fitokannabinoidu, jakim jest CBG (kannabigerol), którego niewielkie ilości występują w odmianie Finola, a dominuje on w odmianie Santhica. W każdym wariancie ekstrakcji uzyskał inny profil fitokannabinoidów oraz różną masę uzyskanego ekstraktu. Profile kannabinoidów wyznaczył metodą GC-MS. Analizując uzyskane wyniki pomiarów, stwierdził, że największą czystością cechują się ekstrakty n-heksanowe po winteryzacji (ponad 67 % zawartości fitokannabinoidów) oraz etanolu w -45°C (ponad 60 %). Ekstrakty na bazie acetonu i alkoholu etylowego w 20°C wykazały najmniejszą czystość względem fitokannabinoidów, ale ich masy są największe. Oznacza to, jak stwierdza, że te rozpuszczalniki oprócz pożądaných fitokannabinoidów ekstrahują również wiele innych metabolitów wtórnych z suszu. Z kolei proces winteryzacji zmniejsza masę ekstraktu o około 30%, ale zwiększa czystość ekstraktów o około 25%. Według niego oznacza to, że oprócz wosków usunięta została również część fitokannabinoidów. Podaje również, że największa efektywność usuwania fitokannabinoidów z kwiatostanu konopi cechuje alkohole w temperaturze 20°C (metanol > 94%, etanol > 93%, izopropanol >89 %) i eter dietylowy (> 90%). Wynik ten jest jednak zaskakujący, ponieważ poprzednia analiza przeprowadzona przez Doktoranta wykazała, że ekstrakty uzyskane w ten sposób, nie cechują się wysoką czystością w zakresie zawartości fitokannabinoidów. Oznacza to, że alkohole, a w szczególności metanol, usuwają z roślin wiele innych metabolitów wtórnych. Ponadto metanol i etanol wykazują najlepszą zdolność do usuwania CBG (96–97%). Wykazał również wpływ temperatury na efektywność ekstrakcji alkoholowej. Zbadał, że etanol oraz

izopropanol w temperaturze -45°C wykazują lepszą zdolność do ekstrakcji fitokannabinoidów, niż w temperaturze 20°C . Wywnioskował, że ma to prawdopodobnie związek z wytrącaniem się części zanieczyszczeń w postaci wosków w trakcie ekstrakcji w -45°C . *Czy Doktorant mógłby podać, jakie analizy wykonał na podstawie których sformułował ten wniosek?*

Uzyskane ekstrakty poddał także analizie techniką NMR zbierając widma protonowe i węglowe. Pomiary wykonał bez dodatku wzorca wewnętrznego. Celem tych prac było uwidocznienie ewentualnych różnic w obrazie spektroskopowym. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów dla konopi włóknistej (*Cannabis sativa* L.) wykazał, że profil metabolitów wtórnych ekstraktów zależy od użytego rozpuszczalnika organicznego. Dowodzi, że ekstrakcja alkoholowa w 20°C zapewnia najmniejszą selektywność uzyskanego profilu metabolitów wtórnych, ale obniżenie temperatury zwiększa ją i pozwala na zredukowanie ilości zanieczyszczeń nawet o 15%. Najlepszą selektywnością uzyskał dla ekstrakcji za pomocą węglowodorów krótkołańcuchowych, co jak stwierdza, że zapewne ma związek z nierozpuszczaniem się części związków polarnych w n-heksanu. W próbkach poddanych winteryzacji nie wykrył substancji charakterystycznych, ale zauważył, że cechuje je większe stężenie fitokannabinoidów. Przeprowadzając te badania badania pokazał, że użyty ekstrahent ma istotny wpływ na profil fitokannabinoidów w ekstraktach. Wnioskuje, że wybór rozpuszczalnika organicznego do ekstrakcji kwiatostanu konopi powinien zależeć od przeznaczenia ekstraktu, co ma ogromne znaczenie dla wyników późniejszych badań.

W przedostatnim kroku Doktorant wykonał analizę profilu frakcji lotnych. Przeprowadził również eksperymenty związane oznaczeniem profilu terpenowego wybranych odmian konopi włóknistych techniką GC-MS, w trakcie ich przechowywania, w okresie styczeń-czerwiec 2023 (w tym miejscu Doktorant błędnie wpisał rok 2032). Analizy wykonał wykorzystując mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME), a do badań wybrał odmiany Finola, Futura, Fibror, Santhica i Matternhorn. Z przeprowadzonych badań wywnioskował, że warunki i czas przechowywania mają ogromne znaczenie, i jest to bardzo istotna, z punktu widzenia badań jakościowych porównawczych obserwacja, ponieważ wykonanych pomiarów wynika, że związki lotne konopi zmieniają się w trakcie przechowywania i nabierają cech indywidualnych, co stwarza możliwość ich porównywania, a w konsekwencji analizę tożsamościową.

W ostatnim kroku badań została wykonana analiza genetyczna. Genomowe DNA wyekstrahowano z każdej próbki przy użyciu zestawu Fast DNA Plant Screen PCR A&A BIOTECHNOLOGY zgodnie z instrukcjami producenta.

Analizując uzyskane sekwencje w programie do obróbki danych genetycznych Doktorant stwierdził, że miejsce przyłączenia starterów jest inne niż zakładano, a produkty nie opiewają sekwencji konserwatywnych. Wskazuje to na nieprawidłowe dobranie starterów lub mało

uniwersalny ich charakter. Ewentualnie wskazywać to może też na bardzo dużą różnorodność genetyczną konopi i na brak możliwości zastosowania wybranych par starterów dla wszystkich odmian lub odmian różniących się pochodzeniem geograficznym.

W tym przypadku opracowanie uniwersalnego zestawu starterów spełniającego oczekiwania wymaga znacznie szerszej zakrojonych badań, które przekraczają możliwości jakie stwarza projekt Doktorat Wdrożeniowy.

Zakres badań niezbędny do realizacji celu, jaki założył mgr inż. Andrzej Kwaśnica wymagał od Autora poznania wielu metod statystycznych. W tym względzie Autor wykazał się dojrzałością i dobrym przygotowaniem w projektowaniu doświadczeń oraz świadomością założeń oraz przeznaczeniem poszczególnych badań, a także wykorzystaniem nowoczesnych pakietów statystycznych i zastosowaniem odpowiedniej metody statystycznej do opracowania wyników, co pozwoliło Autorowi interpretować poprawnie wyniki w oparciu o logiczny i przemyślany cykl badawczy. Dlatego, do mocnych stron pracy należy zaliczyć sposób i zakres przeprowadzonych analiz statystycznych.

W rozdziale Dyskusja wynika, że prace przeprowadzone w ramach prezentowanego doktoratu wdrożeniowego prowadzone były w wielu, mocno zróżnicowanych obszarach. Wspólnym mianownikiem prowadzonych przez Doktoranta prac było opracowanie przez Niego metody na porównywanie próbek materiałów roślinnych ze sobą oraz wskazanie ich pochodzenia. Skupiono się na konopiach, roślinie generującej większość problemów badawczych w codziennej praktyce firmy Lab4Tox sp. z o.o. Konopie potraktował również jako model dla badań nad innymi surowcami roślinnymi. Prace skupił wokół problemu porównania profilu metabolitów wtórnych pochodzących z różnych grup, tj. związki lotne (w tym terpeny), fitosterole czy kannabinoidy. Jednocześnie badania jakie przeprowadził obejmowały szereg prac optymalizacyjnych na chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas – Shimadzu 2020 QP Ultra Plus.

W rozdziale Wnioski Autor w formułuje 9 wniosków, na podstawie przeprowadzonych badań i analiz. We wniosku 9 napisał: „Doświadczenia zdobyte w trakcie pracy badawczej umożliwiły stworzenie 3 procedur analitycznych identyfikacji konopi w tym porównawczych. Były one użyte w wielu opracowaniach stworzonych dla zarówno Prokuratury, Policji, jak i osób prywatnych w firmie Lab4Tox.”. Jest to raczej stwierdzenie bardziej nadające się do treści podsumowania, a nie jako wniosek z wykonanych badań.

Dorobek naukowy Doktoranta stanowi 6 publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym IF równym 28,300 oraz sumą punktów MNiSW równą 840. Jest także autorem 24 wdrożeń.

Podsumowując, chcę podkreślić, że zakres prac eksperymentalnych został bardzo szeroko zakrojony i Autor uzyskał wiele interesujących i wartościowych wyników z doświadczeń laboratoryjnych, które w mojej ocenie były prowadzone prawidłowo. Zaletą pracy jest również szeroki zakres badań z zastosowaniem wielu różnych metod i technik (chemicznych, fizycznych i genetycznych) w celu opracowania nowych metod analizy materiałów roślinnych oraz produktów pochodzenia roślinnego umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację, co jest mocną stroną przedstawionej pracy.

Uwagi redakcyjne

Praca przygotowana jest starannie, mimo to Autor nie ustrzegł się niedociągnięć głównie o charakterze edycyjnym, stąd w celu uniknięcia ich podczas przygotowania pracy do druku lub publikowania wyników w czasopismach naukowych oraz prowadzenia dalszych badań pragnę zwrócić uwagę na pewne zagadnienia oraz proponuję wprowadzić następujące niewielkie korekty:

- Występuje bardzo dużo błędów edytorskich, występują braki wyrazu w zdaniu, braki litery w wyrazie. Są to oczywiście błędy, które są łatwe do wyeliminowania, ale ich ilość jest znaczna.
- We wniosku 9. Doktorant napisał, że „Na podstawie danych z lat 2018-2021 brak jest wyraźnych statystycznych zależności pomiędzy odmianami konopi a profilem kannabinoidowym (wg GC-MS) identyfikowanym w ekstraktach (przemysłowych pastach konopnych) i materiałach roślinnych.”. Sugerowałbym zmianę stwierdzenia „statystycznych zależności” na „statystycznych różnic”.
- We wniosku 9. Doktorant stwierdza: „Doświadczenia zdobyte w trakcie pracy badawczej umożliwiły stworzenie 3 procedur analitycznych identyfikacji konopi w tym porównawczych. Były one użyte w wielu opracowaniach stworzonych dla zarówno Prokuratury, Policji, jak i osób prywatnych w firmie Lab4Tox.”. Jest to raczej stwierdzenie bardziej nadające się do treści podsumowania, a nie jako wniosek z wykonanych badań.

Wszystkie moje uwagi i pytania podaję jako wskazówki do wykorzystania w przyszłych badaniach i publikacjach oraz mam nadzieję, że mogą być pomocne przy doskonaleniu metod analizy materiałów roślinnych oraz produktów pochodzenia roślinnego umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację.

Wniosek Końcowy

Jeszcze raz podkreślam, że istotnym elementem pracy było opracowanie metod analizy materiałów roślinnych oraz produktów pochodzenia roślinnego umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację. Istotną część pracy stanowią także wyniki uzyskane podczas badań genetycznych oraz sensorycznych.

W oparciu o dobraną metodykę badań, uzyskane wyniki i ich analizę, a także wnioski końcowe można jednoznacznie stwierdzić, że założone przez mgr inż. Andrzeja Kwaśnicę cele zostały osiągnięte, a strona merytoryczna pracy jest poprawna i analiza statystyczna została starannie przeprowadzona. Tytuł rozprawy „**Opracowanie procedur określania pochodzenia materiału roślinnego metodami chromatograficznymi i genetycznymi**” odpowiada celowi pracy, w której opracowanie metod analizy materiałów roślinnych oraz produktów pochodzenia roślinnego umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w zakresie technologii żywności i żywienia i uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85, ze zm.) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie technologia żywności i żywienia. W związku z tym przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Andrzeja Kwaśnicy do dalszego toku przewodu doktorskiego.

Dr hab. Marek Gancarz, Prof. URK