

Szczecin 14 listopada, 2024

prof. dr hab. inż. Artur Bartkowiak  
Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych  
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Ocena pracy doktorskiej p. mgr. inż. Jakuba Adama Czyżewskiego  
**p.t.: „Badanie możliwości wykorzystania niekonwencjonalnych technik w procesie ekstrakcji związków bioaktywnych z wyłoków jabłkowych oraz marchwiowych”**

wykonanej w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
w Instytucie Nauk o Żywności w Katedrze Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji  
pod kierunkiem prof. dr hab. Doroty Witrowej-Rajchert  
oraz promotora pomocniczego dr. hab. Artura Wiktor, prof. SGGW

Podstawą opracowania oceny jest:

- pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia SGGW w Warszawie prof. dr hab. inż. Mirosława Słowińskiego z dnia 30 września 2024 roku, który na wniosek Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia SGGW w Warszawie z prośbą o dokonanie recenzji ww. pracy doktorskiej;
- praca doktorska mgra inż. Jakuba Adama Czyżewskiego

W okresie ostatnich kilkunastu lat można zaobserwować wzrastające zainteresowanie wykorzystaniem produktów odpadowych przemysłu-rolno-spożywczego do różnych zastosowań w tym procesów pozyskiwania bioaktywnych substancji pochodzenia naturalnego. W związku z tym uważam wybór tematu pracy, mający na celu ocenę możliwości wykorzystania pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) jako obróbki wstępnej oraz ultradźwięków (US) zastosowanych w trakcie procesu do wspomaganie ekstrakcji związków bioaktywnych oraz charakterystykę otrzymanych ekstraktów z wyłoków jabłkowych oraz marchwiowych jako celowy i trafny z punkt widzenia oryginalności pracy badawczej, gdzie przykładem tego rodzaju pracy jest rozprawa doktorska mgra inż. Jakuba Adama Czyżewskiego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 94 strony i została podzielona na 7 części plus wykaz dorobku naukowego. Po streszczeniu w języku polskim i angielskim i krótkim wstępie autor dokonał przeglądu literatury podzielonego na dwie zasadnicze części, gdzie pierwsza dotyczy charakterystyki i możliwości zagospodarowania odpadów przetwórstwa owocowo-warzywnego i druga opisująca metody ekstrakcji stosowane w technologii żywności. Cel i zakres pracy wraz z hipotezą badań został wydzielony w pracy jako oddzielna część. Metodyka pracy została podzielona kolejno na sekcje opisujące plan badań, charakterystykę surowców, metody technologiczne, metody analityczne oraz metody matematyczne i graficzne. Kolejna obszerna sekcje dotyczy omówienia i dyskusji wyników, następnie podsumowanie i wnioski, spis piśmiennictwa i na zakończenie aneks poświęcony

wynikom analizy statystycznej. Ogólnie układ pracy jest poprawny i typowy dla tego typu opracowań badawczo-naukowych.

„Przegląd literatury” liczący 32 strony jest zwięzłą próbą zaprezentowania obecnego stanu wiedzy i genezy wyboru celu pracy w świetle informacji na podstawie dostępnej literatury. Doktorant w wprowadzeniu opisuje stan wiedzy na temat rynku produktów warzywno-owocowych ze szczególnym uwzględnieniem marchwi i jabłek oraz wskazuje na obecne zmiany przepisów prawnych, produkcyjnych w tym technologicznych oraz kulturowo-społecznych jakie mają wpływa na zmiany popytowo-podażowe związane z rynkiem przetwórstwa spożywczego. W dalszej części został opisany proces zagospodarowania produktów odpadowych sektora warzywno-owocowego. W opisie metod przetwórstwa w kierunku zagospodarowania produktów odpadowych przemysłu rolno-spożywczego z przeznaczeniem otrzymywania innych materiałów doktorant powinien poza ogólną informacją na temat kierunków zagospodarowania (str. 25) skupić się na obszarach jakie dotyczą surowców jakie były obszarem zainteresowań w ramach jego doktoratu bez opisów informacji i wyników publikacji dotyczących wykorzystania innych odpadów np. z wyłoków pomidorowych (na stronie 27 zacytowano aż 5 prac dotyczących tej tematyki) czy innych dotyczących odpadów aronii czarnej, kakao czy pszenicy. Bez szkody dla samej pracy można byłoby pominąć tekst na stronach 25-33. Tabele 6 ograniczyłbym do zestawienia różnych metod ekstrakcji z określeniem ich zalet i ograniczeń ale z wykorzystaniem jako surowca wyłoków jabłkowych i marchwiowych. W przeglądzie literatury poza ciekawym opisem możliwości intensyfikacji procesów ekstrakcji brak jest indywidualnego opisu i odniesienia do stanu wiedzy dotyczącej zastosowania obu badanych w pracy technik tzn. pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) jako oraz ultradźwięków (US) wykorzystywanych w procesach ekstrakcji substancji bioaktywnych z obu rodzajów wyłoków będących tematem rozprawy. Co ciekawe w samej dyskusji wyników większość prac innych autorów dotycząca tej tematyki została już uwzględniona, dlatego tym bardziej dziwi brak wskazania tych prac w tej części pracy. Niestety w ten sposób zaprezentowane wyniki w części literaturowej nie umożliwiają wprost na zweryfikowanie w pełni oryginalności przyjętego celu i zakresu pracy doktorskiej w świetle obecnego stanu wiedzy.

W wydzielonej części na stronie 42-43 zaprezentowano cel i zakres pracy. Uważam, że wskazany cel pracy dotyczący możliwości wykorzystania pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) jako obróbki wstępnej oraz ultradźwięków (US) zastosowanych w trakcie procesu na efektywność ekstrakcji wybranych związków bioaktywnych i charakterystykę otrzymanych ekstraktów z wyłoków jabłkowych oraz marchwiowych jest interesujący szczególnie w kontekście określenia możliwości wykorzystania jednocześnie obu metod, co według mnie zostało dotychczas opisane tylko w jednej pracy dla wyłoku jabłkowego. Badania ilościowo-jakościowe otrzymanych ekstraktów obejmowały pomiar zawartości ekstraktu, określenie właściwości optycznych, oznaczenie zawartości ogółem polifenoli, oznaczenie zawartości ogółem flawonoidów; oznaczenie zawartości karotenoidów (wyłoki marchwiowe), oznaczenie zdolności przeciwutleniającej na podstawie reakcji wygaszania rodnika DPPH oraz kationorodnika ABTS<sup>•+</sup>. Na uwagę zasługują badania przeprowadzone na materiale w postaci obu wyłoków otrzymanego zarówno w warunkach laboratoryjnych oraz przemysłowych. Co do zaprezentowanych hipotez badawczych w mojej opinii tylko hipoteza 3 i 4 można uważać za oryginalne, natomiast hipotezy 1 i 2 są opisane zbyt ogólnie i wymagają lepszego doprecyzowania gdyż w obecnym zapisie można stwierdzić, że zostały ona już potwierdzone w innych wcześniejszych pracach naukowych jakie są częściowo cytowane przez doktoranta.

Rozdział „Część eksperymentalna” obejmuje omówienie planu badań w ramach dwóch etapów. Etap pierwszy obejmował łącznie 10 eksperymentów z zastosowaniem metody ultradźwiękowej (zmienna moc 180 i 300W oraz częstotliwość) i PEF (zmienna liczba impulsów) samodzielnie oraz połączenie sekwencyjne obu procesów razem przy stałym czasie ekstrakcji wynoszącym 60 min. Etap drugi obejmował łącznie 28 eksperymentów dla różnych stosunków wypełnienia w zakresie 10-90 w przypadku metody ultradźwiękowej i różnej liczby impulsów PEF w zakresie 10-50, gdzie łącznie każdy z nich był wykonany dla trzech czasów ekstrakcji w zakresie 30-90 minut. Niestety w tym miejscu zabrakło właściwego opisu w tabeli 8 i samym tekście powiązania opisu rodzajowego zaplanowanych prób z zastawianą metodą planowania eksperymentu, gdzie w eksperymencie mamy po trzy takie same próby w obu metodach ekstrakcji. Surowcem wykorzystanym do otrzymania wyłoków w warunkach laboratoryjnych były odpowiednio wyselekcjonowane owoce jabłoni domowej *Malus domestica* oraz korzenie marchwi zwyczajnej *Daucus carota*, które pozyskano na rynku detalicznym. Natomiast wyłoki przemysłowe otrzymano z zakładów przetwórczych, z tej samej partii produkcyjnej. Kolejne procesy obróbki wyłoku otrzymanego w warunkach laboratoryjnych prowadzono według tej samej powtarzalnej metodyki i po zakończeniu poddano standardowej metodzie wirowania po czym otrzymany ekstrakt przechowywano w temperaturze chłodniczej przed dalszymi procesami charakteryzacji.

Badania jakościowe właściwości otrzymanych ekstraktów obejmowały kolejno: oznaczenie zawartości suchej substancji, zawartości ekstraktu, oznaczenie barwy, zawartości polifenoli, flawonoidów, karotenoidów oraz reakcji oznaczanie aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem dwóch wskaźników (reakcji wygaszania rodnika DPPH\* oraz kationorodnika ABTS\*\*). Sądzę, że opisane metody analityczne powinny być opisane bardziej precyzyjnie np. z ilością użytych substancji w metodach nie standardowych na podstawie przypisanych metodyk. W przypadku zastosowania metod pomiaru pośredniego przedstawiono stosowne zależności/równania, które pozwoliły na obliczenie poszczególnych wielkości.

Do analizy statystycznej zastosowano dwa różne specjalnie dobrane modele do oceny istotności ( $\alpha = 0,05$ ) zróżnicowania pomiędzy próbami wykorzystano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, sprawdzający hipotezę o równości median w poszczególnych grupach. W etapie drugim pracy zaprojektowano doświadczenie stosując metodę płaszczyzn odpowiedzi (RSM) i centralny plan kompozycyjny ortogonalny (CCF). Zabrakło w tym miejscu lub w samej części opisowej dyskusji wyników informacji dlaczego dokonana została wybrała właśnie tego rodzaju zróżnicowanej analizy statystycznej.

Rozdział 4 stanowi zasadniczą część pracy, opisując poszczególne przeprowadzone badania, otrzymane wyniki i ich interpretację i obejmują dwie oddzielne części dotyczące badań na wyłokach jabłkowych (4.1 – str. 57-88) oraz wyłokach marchwiowych (4.1 – str. 89-153).

Wyłoki jabłkowe otrzymane w warunkach laboratoryjnych charakteryzowały się niższą zawartością suchej masy na poziomie 22,59 ( $\pm 1,5$ )% od wyłoków jabłkowych otrzymanych w warunkach przemysłowych, wynoszącej 24,29 ( $\pm 0,43$ )%, gdzie dodatkowo badane wyłoki cechowały się zdecydowanie większą powtarzalnością zawartości suchej masy, co może świadczyć w tym miejscu o zdecydowanie lepszej powtarzalności procesu przemysłowego. Co ciekawe podobne różnice i zależności można zauważyć dla wyłoków marchwiowych (str. 89). Na podstawie analizy wyników w tabeli 4 nasuwa się pytanie skąd może wynikać tak duża rozbieżność wyników dla trzykrotnie powtarzanych takich samych procesów z zastosowaniem pulsacyjnego pola elektrycznego (PE5, PE7 i PE8 – zakres zmian zawartości ekstraktu od 0,45 do 0,8°Bx – 43%) oraz dla ultrasonifikacji (US5, US7 i US8 – 0,6 do 0,8 °Bx – 25%). Niestety tak duże rozrzuty wyników wobec podobnego zakresu zmian dla wszystkich pozostałych prób

(odpowiednio 0,35-0,8 oraz 0,45-0,8) już na wstępnym etapie realizacji badań sugerowały brak zasadności statystycznie uzasadnionej analizy porównawczej otrzymanych wyników, co zresztą autor sam potwierdził prezentując wykresy Pareto dla wszystkich analiz istotności badanych czynników wykonanych z wykorzystaniem wycieków jabłkowych nie tylko na zawartość ekstraktu (rys. 3 i 4) ale także w przypadku badania jasności (rys.9 i 10), współrzędnych chromatycznych  $a^*$  (rys. 12 i 13) i  $b^*$  (rys. 19 i 20) czy zawartość flawonoidów (rys. 23 i 24) niezależnie od zastosowanej metody ekstrakcji. Dlatego w tym miejscu pojawia się bardzo istotne pytanie co mogło być powodem tak dużych rozrzutów oznaczonych wielkości we wskazanych przeprowadzonych identycznych próbach?

Wszystkie przeprowadzone w pracy badania i opisu wyników dla wycieków jabłkowych i marchwiowych są co do zasady poprawne z przejętą analizą metodą płaszczyzn odpowiedzi przy dwóch czynnikach zmiennych na trzech poziomach (czas ekstrakcji i liczba impulsów PEF lub czas sonifikacji i współczynnik wypełnienia). Jednakże w przypadku wycieków jabłkowych ze względu na brak istotnych różnic statystycznych niestety nie mają one istotnego znaczenia z punktu widzenia końcowych wniosków wskazujących na wpływ określonych parametrów na otrzymane wyniki badań ilościowych. Inaczej sytuacja ma się w przypadku badań dla wycieków marchwiowych, gdzie istotność różnic pozwoliła autorowi na dokonanie stosownych porównań. Szczególnie ciekawe w tym kontekście wydają się wyniki oraz wnioski z badań przeprowadzonych dla przemysłowych wycieków marchwiowych, gdzie wykazano, że aby uzyskać najlepsze rezultaty należy w przypadku metody PEF zastosować intensywniejszą obróbkę (większa liczba impulsów) oraz w przypadku obróbki ultradźwiękowej większy współczynnik wypełnienia fali, gdzie jednocześnie należy zwracać uwagę na samą intensywność fal, gdyż proces ten ma zdecydowanie bardziej inwazyjny charakter pod względem możliwości zachodzenia zmian chemicznych.

Dyskusja otrzymanych wyników w odniesieniu do prac innych autorów prac stosujących podobne metody i warunki ekstrakcji wskazuje na pewne logiczne podobieństwa wskazane przez doktoranta w zależności zarówno od samych parametrów zastosowanych metod oraz ich sekwencji.

Podsumowując, należy stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska posiada wysoką wartość poznawczą dotyczącą ciekawych alternatywnych metod poprawy procesów ekstrakcji. Doktorant przeprowadził usystematyzowane badania możliwości poprawy wydajności ekstrakcji w tym właściwie dokonał wyboru rodzaju weryfikowanych parametrów określających właściwości fizyko-chemiczne w tym rodzaj bioaktywnych substancji.

Jakość wykonanych przez mgra inż. Jakuba Czyżewskiego badań oraz sposób ich opisu oceniam pozytywnie. W trakcie lektury części doświadczalnej oraz opisu wyników przeprowadzonych badań nasunęły mi się pewne pytania i dlatego proszę, aby Doktorant w czasie obrony ustosunkował się do następujących kwestii:

Str. 46-47: Proszę o bardziej szczegółowe wyjaśnienie zastosowanych procesów obróbki wycieków: 1. homogenizacja pkt. 3.3.2 – dlaczego wybrano akurat takie warunki czas 5 min i prędkość obrotowa 20 tys./min – czy prowadzone były jakieś badania wstępne?; jaka była stosowana wielość/masa próbki i rodzaj układu homogenizującego, czy lepkość/rozcieńczenie układu wodą miało wpływ na efektywność homogenizacji, czy dokonano pomiaru lepkości i lub obserwacji mikroskopowych tzn. wielkości rozdrobnionych cząstek przed i po procesie homogenizacji; 2. Obróbka wstępna pulsacyjnym polem elektrycznym (pkt. 3.3.3) oraz 3. ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (pkt. 3.3.5.) – proszę o omówienie przyczyn wyboru wykorzystanych warunków i parametrów obu procesów?

Str. 57 i 89. Czy podobne zależności co do zawartości i powtarzalności wyników oznaczeń zawartości suchej masy wyłoków zarówno wyłoku jabłkowego i marchwiowego otrzymywanych w warunkach laboratoryjnych i przemysłowych mogą świadczyć o większej powtarzalności i wyższej skuteczności procesów otrzymywania wyłoków przemysłowych? Czy próbowano korelować wyniki zawartości pozostających składników bioaktywnych w obu rodzajach wyłoków z tymi na przykład dla otrzymanych soków czy wyjściowych surowców? Po drugie wobec tak odmiennych wyników wydajności ogólnej i specyficznych parametrów co do aktywności otrzymanych ekstraktów na ile zastosowany proces otrzymywania obu wyłoków w warunkach laboratoryjny można faktycznie traktować jako zbliżony do typowo stosowanych procesów przemysłowych?

Str. 154: W pracy nie przeprowadzono pogłębionej dyskusji przyczyn braku możliwości ekstrapolacji wyników badań ekstrakcji związków bioaktywnych z wyłoków otrzymanych w warunkach laboratoryjnych do przemysłowych (wniosek 1). Szczególnie interesujące byłyby autorskie sugestie doktoranta w świetle własnych obserwacji i spostrzeżeń jak takie badania powinny być prowadzone aby uzyskać w możliwie szybki i powtarzalny sposób weryfikację i dobór optymalnych warunków dla obu zaproponowanych procesów z wykorzystaniem wyłoku przemysłowego.

Chciałbym poprosić także, aby doktorant odniósł się do wyników nie cytowanych w rozprawie doktorskiej wcześniejszych trzech innych prac:

1. Lohani, U. C., & Muthukumarappan, K. (2016). Application of the pulsed electric field to release bound phenolics in sorghum flour and apple pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 29-35.
2. Kobus, Z., Wilczyński, K., Nadulski, R., Rydzak, L., & Guz, T. (2017). Effect of solvent polarity on the efficiency of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from apple pomace.
3. Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., & Elez-Martínez, P. (2019). Influence of pulsed electric fields processing on the bioaccessible and non-bioaccessible fractions of apple phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 59, 206-214.

w tym, aby określić różnice w założeniach swojej pracy doktorskiej oraz na ile otrzymane wyniki i wnioski pracy doktorskiej różnią się lub są komplementarne z konkluzjami jakie zostały zaprezentowane w powyższych publikacjach.

Pracę zamykają syntetyczne wnioski końcowe oraz zawierający aż 362 pozycji spis cytowanej literatury. Wnioski są zaprezentowane i sformułowane prawidłowo, adekwatnie do zakresu badań i otrzymanych wyników ze wskazaniem najważniejszych według doktoranta obserwacji wynikających z poszczególnych badań jakie zostały wykonane w pracy. We wnioskach potwierdzono niestety brak możliwości wskazania optymalnych warunków procesów ekstrakcji dla wyłoków jabłkowych natomiast udało się wskazać takie optymalne warunki dla wyłoków marchwiowych. Szkoda, że w podsumowaniu autor nie pokusił się o dyskusję nad realnością techniczną i ekonomiczną zaproponowanych metody w kontekście produkcji wielkotonażowej wyłoków jabłkowych i ew. porównania tej metody do innych obecnie stosowanych albo wdrażanych metod. Czy można się dowiedzieć jak może być koszt wdrożenia i zastosowania takiej metody oraz jakie są obecne realne możliwości skalowania vs. ewentualne korzyści wynikające z zastosowania obu metod w innych znanych procesach związanych z przerobem produktów odpadowych? Dodatkowo czy produkty odpadowe otrzymywane w procesach przemysłowych tłoczenia jabłek i marchwi obecnie w świetle obowiązujących przepisów w naszym kraju mogą być wykorzystane w procesach ekstrakcji i pozyskiwania substancji jakie mogą być ponownie wykorzystane jako dodatki w procesach produkcji żywności? Chciałbym podkreślić, że wszystkie powyższe pytania wynikają

z mojej jako recenzenta ciekawości i w żaden sposób nie obniżają wartości naukowej i poznawczej ocenianej pracy.

Od strony graficznej praca jest wykonana starannie, z czytelnymi tabelami, rysunkami oraz ciekawymi wykresami np. powierzchniowymi odpowiedziami dla zmiennych parametrów. Zabrakło mi natomiast ogólnego schematu graficznego postępowania i realizacji badań, co z pewnością ułatwiłoby zrozumienie kolejności zastosowanych procesów jednostkowych i zakresu przeprowadzonych badań. W pracy pojawiają się nieliczne błędy edytorskie w tym interpunkcyjne oraz nieprecyzyjne lub czasami niewłaściwe określenia wynikające m.in. z bezpośredniego tłumaczenia pewnych sformułowań z języka angielskiego. Na przykład na stronie 47 w opisie procesu ekstrakcji i rozdziału za pomocą odwirowywania wskazano na „częstotliwość wirowania” 6000 obr/min, natomiast powinna być „szybkość obrotowa” (podobne sformułowania są używane na stronie 46 i 52 dot. homogenizacji i mieszania).

Wszystkie przytoczone powyżej uwagi wynikają z moich jako recenzenta wątpliwości oraz pytań do dyskusji w trakcie obrony pracy doktorskiej. Chciałem jeszcze raz podkreślić moją pozytywną opinię na temat wysokiego poziomu poznawczego i merytorycznego pracy doktorskiej mgr inż. Jakuba Adama Czyżewskiego. Dodatkowo należy zwrócić uwagę, że autor doktoratu uczestniczył aktywnie także w innych badaniach związanych z tematyką dotyczącą wykorzystania różnych procesów technologicznych w tym zastosowania PEF do obróbki m.in. jabłek, marchwi i buraka (6 publikacji, jeden rozdział w monografii i 9 doniesień konferencyjnych)

Zaproponowany w pracy sposób wykorzystania różnych metod ekstrakcji wydaje się być bardzo interesujący i może stanowić ciekawą proekologiczną alternatywę dla obecnie stosowanych procesów wykorzystywanych w technologii żywności. Otrzymane wyniki stymulują do dalszych badań związanych z poszukiwaniem zarówno alternatywnych nowoczesnych metod obróbki biomasy pochodzenia rolno-spożywczego w tym ich łączenia ze sobą w celu zwiększenia efektywności ekstrakcji różnych związków bioaktywnych. Praca ta bardzo dobrze wpisuje się w obecny trend biogospodarki dot. procesów bezodpadowych „zero waste” w tym poszukiwania nowych ekologicznych rozwiązań jakie przyczynią się do bardziej efektywnego wykorzystania produktów odpadowych przemysłu rolno-spożywczego zwiększających ich wartość w tym wykorzystania ich jako cennych surowców do pozyskiwania substancji bioaktywnych.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą doktorską mgr. inż. Jakuba Adama Czyżewskiego stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi formalne stawiane tego typu opracowaniom zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zm.) o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Technologia Żywności i Żywnienia SGGW w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr. inż. Jakuba Adama Czyżewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

DYREKTOR  
Centrum Bioinżynierii i Innowacyjnych  
Materiałów Opakowaniowych  
Prof. dr hab. inż. Artur Bartkowiak