

dr hab. Alicja Sułek
Zakład Uprawy Roślin i Jakości Plonu
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Kanabus

**pt.: „Wpływ modelowych procesów przetwórczych stosowanych w technologii żywności
na stabilność i profil kannabinoidów oraz terpenów z *Cannabis sativa* L. var. *sativa*”,
wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. inż. Marka Roszko, prof. IBPRS-PIB
w Zakładzie Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności**

Podstawą formalną przygotowania niniejszej recenzji jest Uchwała Rady Naukowej nr /158/2024 z dnia 12.12.2024 roku, Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Profesora Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego

1. OCENA PROBLEMATYKI BADAWCZEJ

Konopie siewne są obecnie obiektem zainteresowań zarówno w Polsce, jak i na całym świecie. Interesują się nimi zarówno producenci rolni, przedsiębiorcy, jak i konsumenci. Roślina ta zyskała na popularności dzięki wielokierunkowemu wykorzystaniu na potrzeby różnych gałęzi przemysłu (włókienniczego, chemicznego, papierniczego, spożywczego, kosmetycznego, farmaceutycznego, energetycznego czy budownictwa). Do cennych związków obecnych w konopiach należą kannabinoidy i terpeny, które wykazują działanie terapeutyczne. Kannabinoidy są jednymi z najważniejszych bioaktywnych związków obecnych w konopiach, ale wśród nich znajduje się psychoaktywny Δ^9 -THC (tetrahydrokannabinol), który jest niepożądanym składnikiem żywności. Aby zapewnić bezpieczeństwo żywności gotowych produktów spożywczych zawierających kannabinoidy, konieczne jest ilościowe oznaczenie tych związków zarówno w surowcu, jak

i w gotowym produkcie. Kannabinoidy mogą być degradowane podczas procesów przetwórczych żywności (obróbka termiczna, czy proces fermentacji). Produkty degradacji kannabinoidów mogą wykazywać działanie zdrowotne lub mieć niekorzystny wpływ na zdrowie ludzi. Analiza kannabinoidów obecnych w żywności wiąże się z wyzwaniami związanymi z matrycami, w których występują te związki, a także z prawidłowym wyborem sposobu przygotowania próbek do danej techniki analitycznej. Dlatego w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej zasadne było podjęcie tematyki badawczej związanej z opracowaniem metody oznaczania kannabinoidów i terpenów w świeżych i suszonych elementach rośliny oraz wpływu procesów przetwórczych na stabilność tych związków w modelowym produkcie spożywczym, uważam w pełni uzasadnione.

2. OCENA STRUKTURY ORAZ FORMALNEJ STRONY PRACY

Niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana w formie hybrydowej. Publikacje stanowiące pracę dokorską ukazały się w latach 2021-2024. Prezentowany cykl publikacji obejmuje następujące prace:

P 1. Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M. Modrzewska, M., Pierzgałski, A. (2021). Cannabinoids – characteristics and potential for use in food production. *Molecules* 26,(21), 6723. IF2020=4.412, MNiSW/MEiN2020= 140 pkt. Udział Autorki doktoratu wynosi 80%.

P 2. Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M. (2023). The development, validation, and application of a UHPLC-HESI-MS method for the determination of 17 cannabinoids in *Cannabis sativa* L. var. *sativa* plant material. *Molecules* 28,(24), 8008. IF2023=4.6, MNiSW/MEiN2023= 140 pkt. Udział Autorki doktoratu wynosi 80%.

P 3. Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M. (2024) Effect of selected drying methods on cannabinoids profile of *Cannabis sativa* L. var. *sativa* inflorescences and leaves. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 74, 4, 1-11. IF2023=2.3, MNiSW/MEiN2024= 100 pkt. Udział Autorki doktoratu wynosi 80%.

P 4. Kanabus, J., Bryła, M., Kycia, K., Markowska, J., Roszko, M. (2024) Exploring the presence of cannabinoids in hemp-infused fermented milk drinks: An analysis of pre- and postfermentation levels. *Molecules*, 29,(21), 5056. IF2024=4.2, MNiSW/MEiN2024= 140 pkt. Udział Autorki doktoratu wynosi 72%.

Suma punktów za opublikowane dotychczas prace, według listy MNiSW zgodnie z rokiem wydania wyniosła 520, a ich sumaryczny IF=15,512. Artykuły stanowiące recenzowaną rozprawę

były opracowaniami współautorskimi, przy czym doktorantka we wszystkich publikacjach jest pierwszym autorem. Deklarowany udział doktorantki w opracowaniach współautorskich wyniósł 72-80%. Wkład doktorantki w powstanie publikacji polegał m.in. na: opracowaniu koncepcji i metodyki badań, wykonaniu analiz, analizie statystycznej wyników badań, przygotowaniu oryginalnej wersji manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje. Prace charakteryzują się wysokim poziomem merytorycznym, staranną redakcją i formą prezentacji wyników, co jest zrozumiałe ze względu na wysoki poziom wybranych przez Doktorantkę wydawnictw odnośnie poziomu merytorycznego i edycji publikacji oraz surowe procedury recenzowania.

W mojej ocenie publikacje te, to tylko część pracy doktorskiej, gdyż przedstawiono w niej dodatkowe wyniki badań, które nie zostały opublikowane, a dotyczyły następujących zagadnień:

1. Opracowanie metody analitycznej oznaczania kannabinoidów w nasionach rośliny *Cannabis sativa* L. var. *sativa*.
2. Opracowanie metody analitycznej oznaczania terpenów w ziele *Cannabis sativa* L. var. *sativa* oraz ocena wpływu metod suszenia wybranych elementów rośliny konopi na stabilność, skład i profil terpenów.
3. Określenie wpływu procesu pieczenia oraz czasu przechowywania pieczywa cukierniczego z dodatkiem wsadu konopnego na bazie liofilizowanego suszu konopnego z *Cannabis sativa* L. var. *sativa* na stabilność, skład i profil kannabinoidów, terpenów oraz wybranych związków lotnych.

Przedstawiony do recenzji zbiór publikacji został uzupełniony o 199 stronicowe opracowanie składające się z sześciu głównych rozdziałów, poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim. W opracowaniu tym zawarto wstęp, wykaz stosowanych skrótów, przegląd piśmiennictwa, cele naukowe i zakres pracy, hipotezy badawcze oraz opisano materiał badawczy i metody badań, omówienie i dyskusję wyników, stwierdzenia i wnioski, i spis literatury. W aneksie zamieszczonym na końcu opracowania wykazano 15 tabel i jedną rycinę.

3. OCENA MERYTORYCZNA PRACY

We wstępie Autorka stwierdziła, że rynek produktów zawierających w swoim składzie produkty konopne dynamicznie się rozwija. Produkty zawierające konopie uznawane są za „nową żywność”, która wymaga szczególnej kontroli i analizy obecnych w niej substancji bioaktywnych. Autorka podkreśliła, że bardzo ważne jest opracowanie odpowiednich metod i warunków przetwarzania konopi, które mają wpływ na stabilność związków bioaktywnych (kannabinoidów i terpenów)

w gotowym produkcie. Ma to szczególne znaczenie przy projektowaniu nowych produktów na bazie konopi, które będą bezpieczne dla konsumenta.

Rozdział: Przegląd piśmiennictwa obejmował pięć podrozdziałów. Autorka dość szczegółowo przedstawiła charakterystykę konopi siewnych *Cannabis sativa* L. var. *sativa*. Wykazała, że rośliny konopi są wszechstronnie wykorzystywane, w tym do produkcji żywności i leków. Za właściwości prozdrowotne konopi odpowiadają związki bioaktywne kannabinoidy i terpeny. Następnie autorka przedstawiła potencjalne możliwości i ograniczenia wykorzystania konopi w produkcji żywności. Podkreśliła, że badania obecności kannabinoidów w produktach żywnościowych są bardzo ważne ze względu na bezpieczeństwo żywnościowe. Zwróciła uwagę, że wykorzystanie konopi w przetwórstwie spożywczym jest trudne ze względu na różne zawartości tych związków w poszczególnych organach rośliny. Doktorantka przeanalizowała z dużą starannością różne techniki analityczne wykorzystywane do identyfikacji kannabinoidów i terpenów. W sposób krytyczny przedstawiła zalety, wady i ograniczenia poszczególnych technik analitycznych. Na uwagę zasługuje cytowana literatura. W większości były to publikacje najnowsze, co świadczyło o bardzo dobrym rozeznaniu obszaru badawczego przez Doktorantkę i jej przygotowaniu do podjęcia badań. Przedstawione w tym rozdziale treści były tylko skrótem informacji zawartych w artykule przeglądowym [P1].

Rozdział: Cel. Zakres pracy i hipotezy badawcze. Przeprowadzony w Publikacji [P1] przegląd piśmiennictwa pozwolił Autorce na wyznaczenie kierunku swoich badań. Stwierdziła, że w dostępnej literaturze nie ma wystarczającej liczby pozycji dotyczących badań z zakresu stężenia poszczególnych kannabinoidów wykazujących zarówno działanie prozdrowotne, jak i psychoaktywne w ziele konopnym i gotowym produkcie. Doktorantka wykazała konieczność opracowania metody analizy tych związków w różnych matrycach, zapewniających reprezentatywne wyniki badań. Autorka wykazała także konieczność opracowania metod produkcji, dystrybucji i przechowania produktów zawierających dodatek konopny na stabilność kannabinoidów i terpenów w gotowym produkcie. Pozwoliło to na sformułowanie czterech celów badawczych oraz wyznaczenie hipotez, które w toku dalszej pracy zweryfikowała. Autorka przedstawiła zakres prac, który obejmował siedem zadań. Przeprowadzone prace były niezbędne do rozwiązania problemu badawczego i weryfikacji postawionych hipotez.

Rozdział: Materiał badawczy i metody badawcze podzielony został w sposób logiczny na część dotyczącą charakterystyki zastosowanego materiału badawczego. Druga część dotyczyła metod badawczych, które zostały właściwie dobrane i wyczerpująco opisane. Oznaczenie 17 kannabinoidów wykonano techniką chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS00),

a szczegółowy opis metody zamieszczono w **Publikacji [P2]**. Analizę 19 terpenów i wybranych związków lotnych przeprowadzono z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). W dalszej części Autorka szczegółowo omówiła metodę suszenia konopi oraz przygotowanie i ocenę produktów zawierających dodatek konopny. Należy podkreślić, że doktorantka bardzo dobrze zaplanowała część doświadczalną pracy, wykazując się przy tym dobrą znajomością warsztatu badawczego.

Rozdział: Omówienie wyników i dyskusja wyników został podzielony na pięć głównych podrozdziałów. Doktorantka omówiła uzyskane wyniki i poddała je dyskusji, porównując z wynikami podobnych prac prowadzonych przez innych badaczy. Przyjęta w opracowaniu kolejność prezentacji wyników była spójna ze sformułowanymi celami naukowymi.

W pierwszym podrozdziale dotyczącym opracowania i walidacji metody analitycznej oznaczania kannabinoidów w świeżych i suszonych organach rośliny oraz nasionach *Cannabis sativa* L zostały zamieszczone wyniki badań zawarte w **Publikacji [P2]** oraz nieopublikowane. Autorka, opierając się na dogłębnej analizie danych literaturowych, na potrzeby realizacji badań i wykonania oznaczeń kannabinoidów w badanych próbkach wykorzystwała technikę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Oceniała skuteczność ekstrakcji kannabinoidów ze świeżego, jak i suszonego ziela konopnego z wykorzystaniem różnych cieczy ekstrakcyjnych. Do oznaczenia 17 kannabinoidów obecnych w świeżym, jak i suchym materiale roślinnym wybrała najlepszą ciecz ekstrakcyjną (metanol). Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że poziom kannabinoidów w poszczególnych organach rośliny był zróżnicowany. Najwyższą całkowitą zawartość badanych związków stwierdzono w małych kwiatostanach, natomiast najniższą w liściach. Autorka, analizując poszczególne substancje stwierdziła, że dominującym kannabinoidem w badanych organach rośliny był CBDA.

Doktorantka opracowaną metodę oznaczania kannabinoidów wykorzystwała do oceny występowania tych związków w 30 próbkach herbat dostępnych na polskim rynku. Autorka wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy całkowitą zawartością 17 kannabinoidów w analizowanych próbkach herbat. Stwierdziła, że herbaty zawierające 100 % suszu konopnego nie zawsze zawierały więcej kannabinoidów niż herbaty o mniejszym jego udziale. Doktorantka stwierdziła, że obecność w badanych herbatach psychoaktywnego THC może stanowić problem dla producentów. W rozdziale tym autorka przedstawiła także badania nieopublikowane dotyczące wyekstrahowania kannabinoidów z nasion konopi. Stwierdziła, że w komercyjnych nasionach z konopi zawartość psychoaktywnego Δ^9 -THC była na niskim poziomie, a dominował CBDA oraz jego neutralna forma CBD.

W następnym rozdziale zostały zamieszczone nieopublikowane wyniki z badań dotyczących opracowania i walidacji metody analitycznej oznaczenia terpenów oraz ocena wpływu suszenia kwiatostanów i liści *Cannabis sativa* L. var. *sativa* wybranymi metodami na sumę oraz profil terpenów. Stwierdzono, że najbardziej odpowiednią cieczą zastosowaną do ekstrakcji terpenów był octan etylu. Doktorantka w przeprowadzonych badaniach wykazała, że najwyższą zawartością terpenów charakteryzowały się kwiatostany małe i średnie. W tym podrozdziale zostały przedstawione badania dotyczące wpływu warunków suszenia na zawartość terpenów w kwiatostanach i liściach konopi. Proces suszenia przeprowadzono trzema metodami: suszenie w temperaturze 20°C bez dostępu światła, liofilizacja oraz suszenie konwekcyjne w temperaturach 50, 60 i 70°C. Wykazano, że dobór temperatury suszenia miał wpływ na końcową zawartość terpenów w kwiatostanach i liściach. Autorka wykazała, że największe straty terpenów powodowało suszenie konwekcyjne w temperaturze w temperaturach 60 i 70°C.

Kolejne badania przedstawione w **Publikacji [P3]** obejmowały ocenę różnych metod suszenia na stabilność kannabinoidów w różnych częściach rośliny *Cannabis sativa* L. var. *sativa*. Wykazano że, tradycyjny proces suszenia (w temperaturze 20°C), w porównaniu ze świeżym materiałem roślinnym, spowodował dwukrotny wzrost analizowanych związków w kwiatostanach. Natomiast w przypadku liści wszystkie testowane metody suszenia spowodowały spadek zawartości kannabinoidów. Autorka wykazała, że odpowiednio dobrane warunki suszenia pozwoliły na uzyskanie bezpiecznego (zawierającego akceptowalną zawartość THC) surowca, który może być wykorzystany do produkcji żywności.

W następnym etapie badań zostały przedstawione wyniki (nieopublikowane) dotyczące oceny wpływu procesu wypieku pieczywa cukierniczego z dodatkiem liofilizowanego suszu z konopi na stabilność termiczną kannabinoidów i terpenów, a także wybranych związków lotnych. Zawartość kannabinoidów w gotowym produkcie cukierniczym zależała od ilości dodatku konopnego. Najwyższą zawartością tych związków charakteryzowały się ciastka z dodatkiem 3% liofilizowanego dodatku konopnego. Proces pieczenia w temperaturach 160 i 200°C skutkował obniżeniem stężenia wszystkich analizowanych związków w gotowym produkcie. Zastosowanie wyższej temperatury (200°C) podczas procesu pieczenia, w porównaniu z formą przed pieczeniem, powodowało zwiększenie stężeń neutralnych kannabinoidów (np. CBD i 9 THC). Działanie wysokich temperatur powodowało ubytek badanych terpenów w gotowym produkcie cukierniczym. Otrzymane modelowe produkty cukiernicze poddano ocenie sensorycznej. Stwierdzono, że najlepszą ogólną jakością charakteryzowały się ciastka zawierające 1% liofilizowanego suszu konopnego.

Kolejne badania przedstawione w **Publikacji [P4]** dotyczyły wpływu procesu fermentacji mlekowej zachodzącej podczas produkcji napoju mlekowego, zawierającego różny rodzaj dodatku konopnego na stabilność kannabinoidów. Jako dodatek wykorzystano: liofilizowany susz konopny,

etanolowy ekstrakt oraz olej konopny w ilości 0,5; 1,0 i 2%. Oceniono zmiany wartości pH i żywotność bakterii w gotowym produkcie w czasie przechowywania. Wykonano także ocenę sensoryczną napojów mlecznych. Doktorantka wykazała, że wybór formy dodatku konopnego do produkcji fermentowanego napoju mlecznego miał wpływ na stabilność zawartych w nim kannabinoidów. Zastosowanie dodatku konopnego w postaci oleju konopnego i liofilizowanego suszu konopnego, pozwoliło na uzyskanie produktów, które po 4 tygodniach przechowywania charakteryzowały się porównywalną lub wyższą sumą kannabinoidów w napoju fermentowanym. Największą degradację kannabinoidów stwierdzono w napojach fermentowanych zawierających etanolowy ekstrakt z konopi. Autorka wykazała ponad 90% degradację psychoaktywnego Δ^9 -THC powstałą w wyniku procesu fermentacji we wszystkich wariantach fermentowanych napojów mlecznych. Czas przechowywania fermentowanych napojów mlecznych nie wpłynął na redukcję bakterii fermentacji mlekowej oraz na wzrost wartości pH sugerującego psucie produktu. Badania wykazały, że rodzaj dodatku konopnego miał wpływ na akceptację sensoryczną produktów fermentowanych. Najlepszą ogólną jakością charakteryzował się napój zawierający 0,5% etanolowego ekstraktu z konopi. Doktorantka w dalszej części pracy przedstawiła badania nieopublikowane, dotyczące określenia stężenia terpenów i związków lotnych w modelowych fermentowanych produktach mlecznych.

W rozdziale: Stwierdzenia i wnioski, Doktorantka po trafnym, ogólnym stwierdzeniu, przedstawiła 11 wniosków, które znalazły pełne odzwierciedlenie w wynikach przeprowadzonych badań. Odnosiły się one do postawionych hipotez badawczych i świadczyły o zrealizowaniu celów pracy.

Rozdział: Spis literatury zawierał 114 pozycji literaturowych, które zostały opublikowane w latach 1976-2024. Należy podkreślić, że aż 49,0% cytowanych publikacji ukazała się w ciągu ostatnich pięciu lat. Tak duża liczba publikacji pochodzących z ostatnich lat wykorzystana przez Doktorantkę do przygotowania opracowania świadczy o dobrej znajomości najnowszej literatury naukowej dotyczącej podjętej tematyki pracy.

UWAGI DYSKUSYJNE I SZCZEGÓŁOWE

1. Uwaga dotycząca pisowni „varietes”, nie piszemy kursywą.
2. Uważam, że zamiast wsad konopny, powinno używać się dodatek konopny.
3. W podrozdziale „Materiał badawczy” Autorka pisze, że rośliny konopi zbierano w szczycie kwitnienia, między dwudziestym dniem po rozpoczęciu kwitnienia, a dziesiątym dniem po

zakończeniu kwitnienia. Wzrost i rozwój roślin określa skala BBCH, więc według tej skali okres kwitnienia obejmuje fazę BBCH 60 do BBCH 69, a pełnia kwitnienia konopi przypada na fazę BBCH 65 (jest to 50% otwartych kwiatów), dlatego uważam, że termin zbioru powinien zostać określony w skali BBCH.

4. Autorka powinna podać informację odnośnie roku zbioru konopi. Warunki pogodowe w okresie wegetacji konopi mogą mieć znaczący wpływ na zawartość badanych substancji bioaktywnych.
5. Czy nasiona konopi użyte do badań dotyczyły odmiany `Białobrzeskie`?
6. Jeżeli Doktorantka dołącza oświadczenie, że publikacja „Exploring the stability of during baking of shorbread biscuits with dired hemp: annalysis of pre-and post-baking levels” jest gotowa do wysłania, to według mojej opinii powinna dołączyć gotowy manuskrypt tej pracy w takiej formie, jak był przygotowany dla danego czasopisma naukowego.
7. W **Publikacji [P4]** nie są prezentowane badania odnośnie terpenów oraz wybranych związków lotnych.
8. W Aneksie w tabelach S9 i S10, podano błędne procentowe zawartości dodatku konopnego.

Mocne strony pracy doktorskiej

1. Duża ilość wysoko punktowanych publikacji wchodzących w skład cyklu.
2. Doktorantka we wszystkich publikacjach jest pierwszym autorem.
3. Dobrze zaplanowana kolejność publikacji i ich tematyki badawczej w cyklu publikacyjnym.
4. Koncepcja badań, która umożliwiła ocenę wpływu procesów przetwórczych stosowanych w technologii żywności na stabilność kannabinoidów i terpenów w modelowych produktach z zastosowaniem różnych form dodatku konopnego.
5. Bardzo obszerny materiał badawczy.

Mając powyższe na uwadze uznaję, że Doktorantka wykazała się wystarczającą wiedzą i umiejętnościami dojrzałego badacza, a uzyskane efekty miały istotne znaczenie poznawcze, jak i aplikacyjne. Uważam, że zamierzone cele badawcze zostały osiągnięte, a rezultaty badań pozwoliły na stwierdzenie, że problem naukowy został rozwiązany w sposób oryginalny.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską oceniam pozytywnie pod względem formalnym, jak i merytorycznym. Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Joanny Kanabus „Wpływ modelowych procesów przetwórczych stosowanych w technologii żywności na stabilność i profil

kannabinoidów oraz terpenów z *Cannabis sativa* L. var. *sativa*” spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261), zgodnie z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii i Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Wacława Dąbrowskiego o dopuszczenie mgr Joanny Kanabus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Alicja Sulek

