

Warszawa, 14.04.2025

Dr hab. Rafał Wołosiak, prof. SGGW
Katedra Technologii i Oceny Żywności
Zakład Oceny Jakości Żywności
Instytut Nauk o Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 166
07-787 Warszawa

R E C E Z J A

rozprawy doktorskiej 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*”**

zrealizowanej w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowym Instytucie Badawczym

pod kierunkiem dr. hab. inż. Marka Łukasza Roszko, prof. IBPRS-PIB

Żywność oferowana na rynku we współczesnych nam czasach ulega wielu przemianom. Poszukiwane i stopniowo wprowadzane na rynek są nowe w naszym kręgu cywilizacyjnym źródła żywności (np. białko owadów, w niedługim czasie prawdopodobnie biomasa drobnoustrojów i inne źródła), co jest po części wymuszone rysującą się perspektywą ograniczenia dostępności tradycyjnych źródeł żywności. Ciekawość ludzka i chęć zwiększenia korzystnego wpływu pokarmu na organizm poprzez rozszerzenie liczby dostępnych źródeł składników bioaktywnych są z kolei motorem do wprowadzenia do produktów spożywczych składników od dawna znanych nam surowców (przede wszystkim roślin), lecz dotychczas niewykorzystanych w tym celu. Dotyczy to chociażby konopi, które są źródłem składników bioaktywnych o udokumentowanym działaniu prozdrowotnym, należących do grupy kannabinoidów: kannabidiolu (CBD) i kwasu kannabidiolowego (CBDA). Jednak rośliny te są także źródłem psychoaktywnych kannabinoidów, których obecność w produktach spożywczych w ilości większej niż dopuszczona przepisami jako nie wywierająca wpływu na organizm może być powodem naruszenia bezpieczeństwa takiej żywności. Sprawę komplikuje fakt, że związki z tej grupy mogą ulegać przemianom pod wpływem obróbki technologicznej lub przechowywania, których efektem może być m.in. powstawanie innych form kannabinoidów. W ten właśnie obszar wpisuje się oceniana rozprawa doktorska.

Formalna ocena pracy

Przedłożona rozprawa doktorska zrealizowana jest w formie hybrydowej dysertacji. Część opublikowana w czasopismach naukowych stanowi cykl czterech publikacjach:

1. Kanabus, J., Bryła, M., Roszko, M., Modrzewska, M., Pierzgalski, A. 2021: Cannabinoids – characteristics and potential for use in food production. *Molecules* 26, 6723

IF₂₀₂₀ = 4.412, MNiSW = 140 pkt

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, 8008

IF₂₀₂₃ = 4.6, MNiSW = 140 pkt

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 = 100 pkt

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, 5056

IF₂₀₂₄ = 4.2, MNiSW = 140 pkt

Rozprawę doktorską stanowi maszynopis, który obejmuje 199 stron tekstu (217 stron wraz z Aneksiem). W jego skład wchodzi 6 numerowanych rozdziałów oraz dodatkowe części pracy. Pełen układ pracy przedstawia się następująco:

- Streszczenie w języku polskim i angielskim
- Wykaz stosowanych skrótów
- Wstęp
- Wykaz publikacji wchodzących w skład dysertacji
- 1. Przegląd piśmiennictwa
- 2. Cel i zakres pracy, hipotezy badawcze
- 3. Materiał badawczy i metody badań
- 4. Omówienie i dyskusja wyników
- 5. Stwierdzenia i wnioski
- 6. Spis literatury
- Aneks

Układ rozprawy doktorskiej jest przejrzysty i zgodny z oczekiwaniami, jakie stawia się tego typu monografiom. Przegląd literatury stanowi krótkie i rzeczowe wprowadzenie do realizowanych badań, szczególnie biorąc pod uwagę obszerną publikację przeglądową otwierającą cykl publikacji. Rozdział „Cel, zakres pracy i hipotezy badawcze” przygotowany jest bardzo skrupulatnie, zawiera bowiem wprowadzenie uzasadniające podjęte badania, cel sformułowany w czterech punktach, cztery hipotezy badawcze oraz szczegółowy zakres pracy. Podobnie opisano materiał badawczy i sposób postępowania z nim, koncepcję części technologicznej, a także szczegółowo przedstawione metody badań, bez wątplenia umożliwiające ich pełne odtworzenie w innym laboratorium. Część „Omówienie i dyskusja wyników” ma charakter hybrydowy. Zrealizowane badania częściowo opublikowano w formie trzech prac oryginalnych, zaś pozostała część wyników przedstawiona i omówiona jest w odpowiednich miejscach tekstu dysertacji. Części oparte na publikacjach uwzględniają skrótowe przedstawienie odpowiednich treści merytorycznych publikacji, załączona jest pełna treść artykułu wraz z dodatkowymi informacjami dostępnymi dla czytelników publikacji oryginalnych. Każda część kończy się oświadczeniem o wkładzie merytorycznym Autorów.

Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami pracy uważam za trafne. Podsumowując stronę formalną pracy mogę stwierdzić, że jest ona przygotowana właściwie i w sposób przemyślany, co pozwoliło na pełne zaprezentowanie badań stanowiących podstawę przygotowanej dysertacji, która pozwala Kandydatce ubiegać się o stopień doktora.

Merytoryczna ocena pracy

Wszystkie cztery monotematyczne publikacje zaprezentowanego cyklu zostały opublikowane w czasopiśmie z listy JCR: trzy w czasopiśmie *Molecules* o uznanej światowej renomie i jedna w *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, najlepszym polskim czasopiśmie z tego zakresu, także o międzynarodowym znaczeniu. Łączny IF tych publikacji przekracza 15,5, zaś suma punktów MNISW wynosi 520. Są to bardzo dobre wyniki, więcej niż wystarczające na rozprawę doktorską, a w omawianej pracy uzupełnione o dodatkowe, nieopublikowane wyniki badań. Należy wyrazić za to uznanie Doktorantce, gdyż wnoszą one istotne aspekty do opublikowanych prac i powodują, że przedstawiona dysertacja ma charakter pełnego opracowania. Wszystkie te publikacje są wartościowe, a trzy opublikowane prace oryginalne wnoszą nowe dane naukowe, które zostały ponadto prawidłowo zinterpretowane i przedyskutowane przez Autorów. Na podstawie załączonych do monografii oświadczeń mogę stwierdzić, że Kandydatka do stopnia doktora w bardzo dużym stopniu (od 72% w artykułach technologicznych do 80% w artykułach analitycznych i przeglądowych) przyczyniła się do powstania tych publikacji, a Jej wkład polegał zarówno na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, jak i na wykonaniu prac badawczych (lub współudziale w wykonaniu w artykułach technologicznych uwzględniających specjalistów z branży), opracowaniu ich rezultatów, analizie statystycznej oraz przygotowaniu tekstu publikacji. We wszystkich publikacjach Doktorantka była pierwszą autorką i pełniła funkcję autora korespondencyjnego.

Podjęte badania zostały bardzo dobrze uzasadnione w dysertacji. Zwiększone zainteresowanie dodawaniem konopi lub produktów ich przetworzenia do żywności, a także obecność psychoaktywnego Δ^9 -THC, towarzyszącego w różnych formach kannabinoidom o działaniu prozdrowotnym, może rodzić poważne obawy dotyczące bezpieczeństwa takich produktów dla konsumentów. Niesie to za sobą potrzebę opracowania wiarygodnych metod oznaczania

kannabinoidów, a bardzo prawdopodobny wpływ (zarówno o charakterze degradacyjnym, jak i poprzez przemiany kongenerów) różnych czynników występujących podczas obróbki żywności (w tym termicznych i biologicznych) na zawartość poszczególnych kannabinoidów powoduje, że niezbędne jest podjęcie badań nad wpływem procesów technologicznych na skład i zawartość tych związków. Problematyka podjęta w pracy została rozszerzona o terpeny, które także mają znaczenie zdrowotne i duży wpływ na jakość sensoryczną produktów spożywczych z ich udziałem.

Zarówno cele pracy, jak i późniejsze etapy badań zostały bardzo dobrze ułożone. Kandydatka podjęła się opracowania metody oznaczania kannabinoidów w materiale biologicznym i w różnym stopniu przetworzonym, opracowania metody oznaczania terpenów w materiale j.w., oceny wpływu różnych metod suszenia materiału biologicznego (co jest podstawową metodą jego utrwalania po zbiorze) na zawartość obu grup związków, a na koniec oceny wpływu procesów technologicznych w różnych matrycach żywnościowych na zawartość obu grup związków.

Hipotezy badawcze są postawione trafnie i mają bezpośrednie powiązanie z powyższymi celami badań.

Materiał badawczy, założenia technologiczne, metody badawcze i sposób postępowania technologicznego zostały opisane bardzo jasno i dobrze stylistycznie, co nie zawsze jest oczywiste. Rozdziały te dostarczają wszystkich niezbędnych informacji uzupełnionych o wiele szczegółów, o które zadbała Doktorantka.

Omówienie i dyskusja wyników badań rozpoczyna się obszerną pracą przeglądową, w której dokonano charakterystyki rośliny *Cannabis sativa* L. var. *sativa*, szczegółowego opisu kannabinoidów: ich struktury chemicznej oraz właściwości (szczególnie bioaktywności w odniesieniu do organizmu człowieka), możliwości wykorzystania w produkcji żywności, a także dotychczasowego stanu wiedzy nt. metod analitycznych wykorzystywanych do oznaczania kannabinoidów i nt. stabilności tych związków. Praca ta ma bardzo obszerny, właściwie erudycyjny charakter i jest ważnym usystematyzowaniem wiedzy na początku podjętej przez Panią Magister pracy badawczej, a także dla badaczy zainteresowanych tą tematyką. Publikacja ta została przygotowana w oparciu o 160 artykułów, a jej opublikowanie w renomowanym czasopiśmie potwierdza jakość opracowania i wagę poruszanej tematyki.

Następnie Doktorantka zajęła się opracowaniem i walidacją metody oznaczania 17 kannabinoidów w materiale biologicznym. W badaniach rozróżniono małe, średnie i duże kwiatostany, badano także liście rośliny. Jest to uzasadnione znacznie różniącą się zawartością tych związków w poszczególnych częściach rośliny. Zoptymalizowano procedurę ekstrakcji testując 5 rozpuszczalników (w tym jedną mieszaninę rozpuszczalników), a następnie przeprowadzając szczegółowo udokumentowaną walidację procedury analitycznej. Wartość analityczną opracowanej metody potwierdzono przy użyciu certyfikowanego materiału odniesienia. Uzyskane wyniki są bardzo satysfakcjonujące. Zweryfikowaną metodę wykorzystano do oznaczenia zawartość badanych związków we własnym materiale oraz w handlowych herbatkach z konopi lub z jej udziałem. Zarówno obliczona zawartość Δ^9 -THC, jak i całkowita obliczona zawartość CBD oraz sumaryczna zawartość oznaczanych 17 kannabinoidów były zdecydowanie najmniejsze w liściach, a największe w małych kwiatostanach (zawartość Δ^9 -THC) lub w małych i średnich kwiatostanach (zawartość CBD oraz sumaryczna zawartość kannabinoidów).

Dalej opisano nieopublikowane efekty walidacji metody analitycznej oznaczania terpenów w konopi oraz jej wykorzystania do oznaczenia terpenów w materiale świeżym i suszonym różnymi metodami w celu określenia ich wpływu na końcową zawartość terpenów. Jest to bardzo istotne ze względu na dużą

lotność tych składników, a jednocześnie wpływ na jakość wysuszonego produktu. Najbardziej obiecujące okazały się liofilizacja oraz suszenie konwekcyjne w najniższej zastosowanej temperaturze, tj. w 50°C. Potwierdzono wpływ części rośliny i jej wielkości przy zbiorze (w przypadku kwiatostanów) na zawartość związków bioaktywnych: zawartość terpenów w liściach była wielokrotnie mniejsza niż w kwiatostanach, a w tych ostatnich zmniejszała się wraz ze wzrostem wielkości kwiatostanów.

W kolejnym etapie badań szczegółowo przeanalizowano wpływ procesu suszenia i wykorzystanej części rośliny na zawartość kannabinoidów w utrwalonym w ten sposób materiale. Badano różne metody suszenia (suszenie naturalne, sublimacyjne i konwekcyjne w trzech temperaturach), a także wpływ czasu suszenia oraz części rośliny i jej wielkości w przypadku kwiatostanów na uzyskaną zawartość kannabinoidów. Powolne, tradycyjne suszenie w zacienionym miejscu i w pokojowej temperaturze było najskuteczniejsze w retencji badanych związków, zaś spośród przyspieszonych metod suszenia zbliżone efekty uzyskano przy użyciu liofilizacji i susząc konwekcyjnie w najniższej temperaturze. Dużą zaletą pracy jest to, że na podstawie zebranych wyników można wskazać korzystne metody utrwalania materiału roślinnego nie tylko w odniesieniu do sumy kannabinoidów lub ich frakcji istotnych ze zdrowotnego punktu widzenia, lecz także w odniesieniu do poszczególnych związków – a także prześledzić zmiany ilościowe kongenerów. Jest to dużo dobrze udokumentowanych danych o uniwersalnym charakterze.

Końcowa część badań dotyczyła określenia zachowania się kannabinoidów i terpenów w modelowych produktach spożywczych. Wybrano produkty o złożonej matrycy i strukturze tworzącej się w procesie technologicznym: ciastka kruche (matryca skrobiowo-białkowo-tłuszczowa, struktura ciasta) oraz jogurty (matryca białkowo-tłuszczowa, struktura skrzepu kazeinowego uwzględniająca naruszone w różnym stopniu micle kazeinowe). Najistotniejszymi czynnikami technologicznymi, mogącymi wpływać na przemiany związków bioaktywnych, było działanie ciepła (oba produkty) oraz metabolizm bakterii fermentacji mlekowej (zmiany pH, możliwe generowanie przemian związków lub ich sorpcja przez drobnoustroje; drugi produkt). Są to wymagające matryce do badań związków lipofilowych, lecz ulegających także ekstrakcji w środowisku polarnym. Wypiek ciastek prowadzono w dwóch różnych temperaturach (160 i 200°C). W obu doświadczeniach zastosowano trzy poziomy dodatki materiału uzyskanego przez wstępne przetworzenie konopi, przy czym w przypadku jogurtów były to dodatkowo trzy różne formy materiału: susz, olejek i ekstrakt etanolowy. W badaniach oznaczano zawartość kannabinoidów i terpenów po mieszaniu składników recepturowych, po wytworzeniu końcowego produktu i podczas jego przechowywania przez okres 4 tygodni. Dodatkowo zarejestrowano ważne aspekty jakości, dobrane adekwatnie do obu produktów (barwa i analiza sensoryczna w przypadku ciastek oraz pH, liczba jtk LAB i analiza sensoryczna jogurtów). Część tych badań już została opublikowana, a część jest przygotowana do publikacji. W badaniach tych uzyskano bardzo ciekawe rezultaty odnoszące się do zmian zawartości obu grup związków w wyniku procesu technologicznego oraz ich stabilności podczas przechowywania. W przypadku jogurtów wyraźnie rysuje się różnica w stabilności kannabinoidów podczas samego procesu przetwórczego i podczas późniejszego przechowywania w zależności od zastosowanego nośnika związków. W tym pierwszym etapie wyraźnie wyróżnia się na niekorzyść ekstrakt etanolowy, czyli niewielka zawartość kannabinoidów oraz pozbawienie ich przynajmniej częściowej naturalnej matrycy skutkuje dużą ich degradacją. Natomiast w przypadku przechowywania można zauważyć ciekawą tendencję wzrostu sumarycznej zawartości 17 kannabinoidów podczas przechowywania wytworzonych jogurtów (pomimo braku istotności statystycznej tendencja potwierdza się niezależnie od wielkości dodatku olejku). Czym by Kandydatka wytłumaczyła to zjawisko?

Przedostatnim numerowanym rozdziałem jest część „Stwierdzenia i wnioski”, w której Doktorantka odnosi się do postawionych hipotez badawczych, słusznie weryfikując je jako potwierdzone badaniami. Dalej przedstawia 11 stwierdzeń, dobrze podsumowujących najważniejsze obserwacje poczynione w pracy. Rozdział ten mógłby zakończyć się wnioskiem końcowym, odnoszącym się do głównej przesłanki podjęcia tych badań. Z przyjemnością wysłuchałbym zdania Pani Magister na ten temat podczas obrony dysertacji.

Praca napisana jest jasno, a wyniki objaśniane z dużą znajomością prezentowanych zagadnień. W pracy znalazły się nieliczne, drobne błędy interpunkcyjne: braki przecinków (lecz pomimo tego tekst jest całkowicie zrozumiały), niekiedy brak spacji pomiędzy wartością a jednostką w polskim tekście („2g”), niepotrzebne spacje przed „°C” czy kropki po jednostce („min.”). Ponadto na stronie 150. Kandydatka podaje, że tłuszcz ma większą temperaturę wrzenia niż woda czy etanol, dzięki czemu rozpuszczalne w nim związki (w tym przypadku kannabinoidy) nie ulegają nadmiernemu podgrzaniu, co zapobiega dekarboksylacji kwasowych form tych związków. Wydaje się, że wyższa temperatura wrzenia tłuszczu spowodowałaby raczej odwrotny efekt (możliwość podgrzania do większej temperatury niż przy zastosowaniu substancji ulegającej wrzeniu w niższej temperaturze). Lepszym wyjaśnieniem byłoby powołanie się na mniejszą przewodność cieplną tłuszczu lub ograniczoną przenikalność ciepła do fazy tłuszczowej, co hamuje wymianę ciepła i w konsekwencji podgrzanie kannabinoidów. Są to jedyne uwagi, jakie mam do tego bardzo szerokiego opracowania i całość oceniam bardzo dobrze.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi dobrze uzasadnione i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego wpływu procesów przetwórczych i przechowywania produktów z dodatkiem składników pochodzących z konopi na zawartość i przemiany kannabinoidów oraz terpenów, których źródłem jest ten surowiec, a ponadto dotyczącego opracowania skutecznych metod ekstrakcji i wiarygodnych metod oznaczania powyższych. Przedstawione w dysertacji badania mają bardzo szeroki zakres (w publikacjach zamieszczone są szczegółowe wyniki zawartości poszczególnych związków bioaktywnych w wielu wariantach układów badawczych). Często są to pierwsze publikacje przedstawiające oznaczenia zawartości kannabinoidów oraz ich przemiany w inne formy w warunkach ściśle odwzorowujących przetwarzanie materiału biologicznego *Cannabis sativa* L. var. *sativa* oraz wytwarzanie i przechowywanie realnych produktów spożywczych z jego udziałem, stanowią więc istotny postęp wiedzy, a poprzez uniwersalność podjętej tematyki wykorzystania konopi w produktach spożywczych i ich bezpieczeństwa niewątpliwie wzbudzą zainteresowanie badaczy w wielu krajach. Zastosowane główne metody badawcze zostały szczegółowo zweryfikowane na potrzeby pracy, dzięki czemu uzyskane wyniki nie są przypadkowe, a powstała z tej części publikacja dostarcza innym badaczom wiarygodnego narzędzia do wykrywania kannabinoidów. Do badań wykorzystano bardzo nowoczesny i adekwatny sprzęt analityczny, a ich efekty mają bardzo praktyczny charakter – zarówno z naukowego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Badania są wreszcie bardzo dobrze zaplanowane i opisane jasno, trafnie i dobrze pod względem stylistycznym. Przedstawiona mi do recenzji dysertacja wyróżnia się pod względem poziomu naukowego w wielu aspektach.

Rozprawa doktorska 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*” spełnia wymagania zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie

wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz. 1897), co pozwala mi wnioskować do Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Pani Magister Joanny Kanabus do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę zaprezentowaną powyżej opinię nt. poziomu naukowego opracowania, wnioskuję do Rady Naukowej o wyróżnienie pracy doktorskiej.

A handwritten signature in green ink, reading "Rafał Wołosz". The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the left.