Warszawa, 10.06.2020 r.

dr hab. Małgorzata Wroniak, prof. nadzw. SGGW
Katedra Technologii i Oceny Żywności
Instytut Nauk o Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Gacy
pt.: **„Ocena przydatności profilowania związków lotnych do monitorowania jakości olejów tłoczonych na zimno"**
wykonanej w Instytucie Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego,
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu,
pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Henryka Jelenia

Podstawą sporządzenia recenzji jest pismo z dnia 08.04.2020 r. prof. dr hab. Magdaleny Rudzińskiej informujące o uchwale Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 19 września 2019 r. z prośbą o ocenę rozprawy doktorskiej. Recenzję wykonano zgodnie z wytycznymi ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Rozprawa doktorska skupia się na badaniu przydatności analizy profilu związków lotnych, opartej na chromatografii gazowej i spektrometrii mas oraz chromatografii gazowej – olfaktometrii, do oceny jakości i właściwości sensorycznych wybranych olejów tłoczonych na zimno. Tematyka rozprawy wpisuje się w aktualny trend obserwowany na rynku związany z promowaniem żywności niskoprzetworzonej, w tym właśnie olejów tłoczonych na zimno, często o bardzo specyficznych cechach sensorycznych. Wysoka wartość żywieniowa tych olejów związana z dużą zawartością kwasów nienasyconych i innych labilnych związków bioaktywnych skłania do poszukiwania nowych, precyzyjnych metod monitorowania ich bezpieczeństwa i jakości. Profil związków zapachowych olejów tłoczonych na zimno zależy od rodzaju surowca, jego wilgotności i czystości, warunków przechowywania, metody obróbki wstępnej, ale również od procesu tłoczenia, oczyszczania czy warunków przechowywania gotowego produktu. W olejach głównymi prekursorami związków lotnych są właśnie wielonienasycone kwasy tłuszczowe, które ulegając utlenianiu mogą prowadzić do powstania niepożądanych ze względów organoleptycznych związków tj. heksanal, heptenal, oktenal. Obecność niektórych skorelowana jest z postępującym pogorszaniem jakości tych olejów w czasie przechowywania, takimi markerami - wskaźnikami jest np. heksanal z nonanalem. Związki lotne w olejach tłoczonych na zimno to głównie krótkołańcuchowe węglowodory, alkohole, ketony, aldehydy, estry, laktony, kwasy karboksylowe, związki siarkowe i azotowe, fenole czy terpeny. Właśnie znajomość związków lotnych odpowiedzialnych za unikalny aromat olejów tłoczonych na zimno może być niezwykle przydatna do oceny ich jakości i przydatności do spożycia.

Monitorowanie zmian zachodzących w czasie procesów technologicznych i przechowywania żywności jest szczególnie istotne, gdyż mają one ogromny wpływ na jej cechy sensoryczne

i bezpieczeństwo. Aby zobrazować różnice w występowaniu związków smakowo-zapachowych i zidentyfikować związki kluczowe dla tworzenia aromatu, zazwyczaj stosuje się chromatografię gazową z olfaktometrią, która wykorzystuje zmysł węchu i umiejętności identyfikowania zapachów przy jednoczesnej analizie chromatograficznej. Nowym podejściem do analizy tej grupy związków jest wykorzystanie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Pozwala to na monitorowanie zmian w profilu związków lotnych, wykazywanie różnic pomiędzy odmianami, analizę wpływu parametrów przerobu czy obserwowanie obniżenia jakości w czasie. Natomiast nowoczesna dwuwymiarowa chromatografia gazowa ze spektometrią mas dodatkowo pozwala na bardzo szczegółową analizę profilu związków lotnych, a w połączeniu z wielowymiarową statystyką może stanowić podstawę do szybkiej charakterystyki danej próbki i wyróżnianie spośród zbioru danych związków – markerów odpowiedzialnych za różnicowanie badanych próbek.

Dlatego w mojej opinii jak najbardziej uzasadnione jest podejmowanie tego typu badań, również nad olejami tłoczonymi na zimno. W związku z powyższym, uważam wybór tematu, zakresu badań i materiału badanego niniejszej pracy za bardzo trafny i aktualny, szczególnie w dobie dbania o wysoką jakość, autentyczność i bezpieczeństwo zdrowotne żywności.

Struktura pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Gacy pt. „Ocena przydatności profilowania związków lotnych do monitorowania jakości olejów tłoczonych na zimno" to 121 stronicowa, typowa praca naukowa. Obejmuje następujące rozdziały: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp teoretyczny (25 stron), omówienie celu, zadań badawczych i hipotezy pracy, opis organizacji badań i metod badawczych (10 stron), przedstawienie wyników i ich dyskusję (50 stron), wnioski, spis rycin i tabel oraz załączniki. Spis piśmiennictwa – umieszczony jest na 10 ostatnich stronach pracy i zawiera 136 pozycji literaturowych. Warto podkreślić, że wykorzystane piśmiennictwo w 96% jest anglojęzyczne, a prace pochodzące z ostatniej dekady stanowią 53%. Przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim. Uzyskane w toku badań wyniki są bardzo wartościowe, a większość z nich została już opublikowana w 3 renomowanych czasopismach z wysokim IF. Prace zostały wykonane we współautorstwie, a Doktorantka jest pierwszym autorem każdej z nich. Manuskrypty te przeszły szczegółową ocenę recenzentów, co potwierdza ich wysoką wartość merytoryczną.

Jednakże z obowiązku recenzenta muszę nadmienić, że oceniana rozprawa zawiera sporo nieścisłości i nieprecyzyjnych sformułowań. Występują w niej pewne usterki, błędy redakcyjne i językowe, wymieniam tu tylko niektóre z nich: niejasna i niepełna numeracja poszczególnych rozdziałów w pracy; brak konsekwencji w formułowaniu tytułów podrozdziałów - szczególnie w metodyce i omówieniu wyników; stosowanie małych liter zamiast wielkich przy skrótowcach, nazwach metod; często nieprawidłowy zapis cytowanych pozycji literaturowych, brak powołań

MWN

literaturowych w omówieniu i dyskusji; brak deklarowanej jednoczynnikowej analizy wariancji; brak części, może mniej istotnych, wyników (np. wolnych kwasów tłuszczowych czy chlorofili).

Ocena merytoryczna pracy

Wstęp teoretyczny został ujęty przez Autorkę w 5 podrozdziałach i zawiera treści dotyczące definicji olejów tłoczonych na zimno, technologii, właściwości sensorycznych, charakterystyki lotnych związków zapachowych i metod analizy tych związków. Na podkreślenie zasługuje aktualna, bogata i anglojęzyczna baza literaturowa, na podstawie której Autorka opisała wybrane tu zagadnienia. Niestety w całym przeglądzie literatury pojawiają się sformułowania bardzo ogólne, często potoczne i skróty myślowe - prowadzące do nieścisłości m.in. na str. 13 wkradły się błędy w schematach technologicznych otrzymywania 3 rodzajów olejów tj.: rafinowanego (brakuje etapu kondycjonowania i tłoczenia), tłoczonego na zimno (nie stosuje się przemywania wodą olejów z nasion po filtracji) i oliwy z oliwek (zapis sugeruje ekstrahowanie oliwy wodą w celu uzyskania oleju z wytłoków oliwnych), a w powołanym tu źródle literaturowym nie można odnaleźć wykorzystanych treści; na str. 14. nieścisłe i błędne jest sformułowanie sugerujące, że oliwa lampante powstaje w wyniku ekstrakcji oleju z wytłoków. Oliwa lampante to nie oliwa ekstrakcyjna, a oliwa z tzw. pierwszego tłoczenia (wirowania), tylko o gorszej jakości - niespożywczej ze względu na wysoką kwasowość i cechy sensoryczne, którą poddaje się rafinacji, by uzyskać kategorię „olive oil". W tym miejscu proszę o przedstawienie prawidłowego opisu technologii oleju rafinowanego z nasion rzepaku, szczególnie przygotowania nasion przed tłoczeniem. Odnotowania wymaga też fakt braku zgodności podawanych treści z powoływanymi pozycjami literaturowymi, np. na str. 16 i 17 są zdania: „Zazwyczaj tłoczenie odbywa się przy wykorzystaniu całych nasion, ale zgodnie z Codex Alimentarius surowiec może zostać poddany wcześniej zabiegom takim jak obłuszczanie, rozdrabnianie czy prażenie" oraz „Zgodnie z Codex Alimentarius temperatura podczas tłoczenia oleju z nasion nie powinna przekroczyć 50°C" w Kodeksie żywnościowym dot. olejów nie ma takich zapisów.

W kolejnym rozdziale Autorka prawidłowo przedstawiła cel pracy oraz opisała 2 zadania i 2 hipotezy badawcze, które w pełni odpowiadają tematowi pracy. Cel pracy został zrealizowany w oparciu o dwa zadania badawcze: 1) profilowanie związków lotnych olejów tłoczonych na zimno, a następnie 2) analiza kluczowych związków zapachowych dla wybranych olejów w odniesieniu do profilowania związków lotnych, które to zostały dokładnie opisane w kolejnym rozdziale "Materiały i metodyka". Autorka podała tu szczegółowy opis czterech głównych doświadczeń, przy okazji charakteryzując materiał wykorzystany do badań (1 – oleje rzepakowe z nasion dwóch odmian, 2 - oleje rzepakowe tłoczone na zimno z linii przemysłowej, 3 - oleje arganowe, 4 - oleje z różnorodnych surowców), a następnie scharakteryzowała skrupulatnie rożne, nowoczesne metody badawcze, głównie chromatograficzne z odniesieniem do poszczególnych 4 eksperymentów. Oprócz analizy związków lotnych i zapachowych metodami chromatograficznymi, w analizowanych olejach monitorowano również skład i zawartość kwasów tłuszczowych, liczby charakterystyczne, zawartość

canololu, zawartość związków fenolowych, aktywność przeciwutleniającą i cechy sensoryczne metodą profilowania. Układ poszczególnych doświadczeń, sekwencja analiz z wykorzystaniem bardzo nowoczesnych analiz instrumentalnych, wielowymiarowe statystyczne opracowanie wyników wskazują na oryginalne podejście Autorki do rozwiązywanego problemu badawczego. Jednak w mojej opinii brak jest pewnej konsekwencji w podejmowaniu kolejnych etapów badań, które nie są powiązane jasno ze sobą. Proszę wyjaśnić: dlaczego użyto różnych warunków do izolacji związków lotnych w poszczególnych eksperymentach (str. 41) - czym się kierowano stosując 2 cm włókno i ilość próbki 5 g w fiolce 20 ml i ekstrakcja w 50°C przez 30 minut, a w kolejnym 1 cm włókno, 250 mg próbki w ampułce 10 ml, ekstrakcja 40°C i tylko przez 5 minut; i dodatkowo inne metody instrumentalne tj. w 1 i 2 - eksperymenty dotyczące olejów rzepakowych, dwuwymiarowa GCxGC z MS, a w 3 i 4 - oleje arganowe i „różne" HRT GC-MS; dlaczego analiza kluczowych związków lotnych metodą chromatografii gazowej z olfaktometrią dotyczyła tylko doświadczenia 1 i 3 (str. 43)? dlaczego zastosowano różne sposoby analizy sensorycznej przy różnych doświadczeniach? Dlaczego w doświadczeniu 1 do oceny profilowej degustatorzy nie wybrali dyskryptora „kapuściany" typowego dla olejów rzepakowych (str. 44 i 45)?

W rozdziale 4 pt. „Wyniki i dyskusja" na 50 stronach Autorka szczegółowo opisała najważniejsze wyniki przeprowadzonych doświadczeń. W dwóch pierwszych podrozdziałach dokładnie scharakteryzowała związki lotne oznaczone metodą dwuwymiarowej chromatografii gazowej z MS w różnych próbkach oleju rzepakowego. Autorka omówiła różnice pomiędzy dominującymi związkami lotnymi w olejach z nasion prażonych i nieprażonych 2 odmian rzepaku. Odnotowała, że w olejach z nasion prażonych dominowały produkty termicznej degradacji aminokwasów (degradacja Streckera) tj. 2 metylo-2-butanal i 2-metylo-2-butenal oraz furfural (reakcje Maillarda) i duże ilości oktanalu, odpowiedzialnego za aromat olejów z nasion prażonych, a spośród siarkowych, charakterystycznych dla nasion rzepaku, kluczowy - siarczek dimetylu. Następnie omówiła profil związków lotnych w olejach rzepakowych z linii przemysłowej tj. olejach z nasion całych, płatkowanych, oraz płatkowanych i kondycjonowanych, z pierwszego lub z drugiego tłoczenia. Bardzo interesujące jest tu połączenie wyników analiz instrumentalnych z tradycyjną analizą sensoryczną. Zauważono różnice pomiędzy profilem związków lotnych ustalonym za pomocą dwuwymiarowej CGxGC z MS a wynikami analizy sensorycznej. Nie mniej jednak stwierdzono przydatność tej metody profilowania jako wskaźnika przeprowadzania pewnych procesów technologicznych, co może stanowić o potencjale aplikacyjnym przeprowadzonych badań .

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, połączenia przez Autorkę bardzo nowoczesnych analiz instrumentalnych i wielowymiarowych metod statystycznych do opracowania uzyskanych wyników, co pozwoliło na precyzyjne wyznaczenie związków kluczowych – odpowiedzialnych za różnicowanie badanych olejów. Analiza PCA wyraźnie wykazała, które z oznaczonych związków lotnych powiązane były z procesem prażnia nasion.

MWw

W odniesieniu do tej części pracy też mam pytanie: na str. 64 pojawia się olej referencyjny (skrót RO), który odbiega składem kwasów tłuszczowych od pozostałych olejów. Proszę wyjaśnić: co to jest „olej referencyjny",„olej z całych nasion rzepaku", „olej z nasion obłuskanych" - tych określeń używa Autorka wymiennie, a o żadnym z nich nie ma mowy w metodyce badań; dlaczego heksanalu jest najwięcej właśnie w tym oleju, jaką metodą został otrzymany tej olej?

W kolejnym podrozdziale omówienia wyników Autorka dokładnie scharakteryzowała profil związków lotnych tym razem oleju arganowego oraz monitorowała jego zmiany w czasie przyspieszonego testu przechowalniczego. Tu izolację i identyfikację związków lotnych prowadzono innymi metodami niż przy dwóch pierwszych eksperymentach. Odnotowano w olejach arganowych głównie obecność aldehydów, ketonów, alkoholi i pirazyny oraz stwierdzono, że głównymi analitami są produkty utleniania olejów. Stwierdzono wyraźne różnice profilu związków lotnych w oleju z nasion prażonych i nieprażonych w czasie ich utleniania, co jasno potwierdzono przeprowadzając analizę PCA. W kolejnym rozdziale, opisującym wyniki ostatniego z eksperymentów, podjęto próbę określenia profilu związków lotnych w 12 różnych olejach świeżych i przechowywanych (w przyspieszonym teście starzenia) tłoczonych z różnorodnych surowców (m.in. len, mak, sezam, konopia, dynia, czarnuszka, argan). Zaobserwowane różnice zaprezentowano na wykresach PCA, które kolejno modyfikowano wyłączając z analizy PCA oleje najbardziej różniące się od pozostałych. Warto podkreślić, że zastosowana tu analiza statystyczna pozwoliła precyzyjnie wyznaczyć związki typowe dla poszczególnych rodzajów olejów, kształtujące ich odmienny profil sensoryczny.

Podsumowaniem badań całej pracy jest ostatni rozdział omówienia wyników, a dotyczący analizy kluczowych związków zapachowych przeprowadzonej dla olejów rzepakowych i arganowych. Jest to połączenie wcześniejszych badań związanych z profilowaniem związków lotnych z analizą sensoryczną olejów i wynikami chromatografii gazowej z olfaktometrią. Chromatografia gazowa z olfaktometrią wg Autorki pozwoliła wyznaczyć aktywne związki zapachowe typowe dla obu rodzajów olejów, a dzięki temu uzyskać wiedzę na temat kluczowych związków, które przyczyniają się do tworzenia aromatu, a także wypływają na zmianę jakości w czasie przechowywania tych produktów. Natomiast profilowanie związków lotnych wg Autorki bardzo dobrze pokazuje różnice pomiędzy próbkami, ale nie zawsze znajduje odbicie w jakości sensorycznej produktu, co może być związane z niskimi progami wyczuwalności tych związków. Warte podkreślenia jest stwierdzenie Autorki, że kluczowe związki zapachowe nie zawsze są potencjalnymi markerami olejów pod względem odmiany, obróbki termicznej czy stopnia utlenienia.

Oprócz podsumowań zamykających omówienie każdego z eksperymentów, w końcowej części pracy Autorka przedstawiła 4 najważniejsze wnioski. Odnoszą się one do celu pracy i postawionych hipotez badawczych, zatem wskazują na pełną realizację zaplanowanych badań. Wykazano zatem, że profilowanie związków lotnych z wykorzystaniem nowoczesnych technik instrumentalnych: dwuwymiarowej chromatografii gazowej ze spektrometrią mas, chromatografii

gazowej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas w połączeniu z wielowymiarową analizą statystyczną pozwala na monitorowanie zmian wynikających z procesów technologicznych lub starzenia/utleniania olejów tłoczonych na zimno. Stwierdzono, że mogą to być narzędzia pozwalające na identyfikację olejów pochodzących z różnych surowców oleistych, a zatem również w perspektywie mogą być przydatne do badania ich autentyczności. Podsumowując co jest najważniejsze, zarówno profilowanie związków lotnych, jak i chromatografia z olfaktometrią mogą być stosowane jako techniki komplementarne w obrazowaniu zmian związków zapachowych, jak i związków lotnych w procesach przetwarzania i przechowywania olejów tłoczonych na zimno.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Anny Gacy dostarcza wartościowych, oryginalnych wyników badań dotyczących profilu związków lotnych olejów tłoczonych na zimno, w tym zapachowych, z wykorzystaniem nowoczesnych metod analizy, dających możliwość identyfikowania związków kluczowych. Dodatkowo przedstawia zależności surowcowe, technologiczne i przechowalnicze wpływające na zmianę profilu tych związków. Wskazuje możliwość wykorzystania zastosowanych tu technik instrumentalnych i statystycznych w praktyce jako narzędzi umożliwiających badanie jakości i autentyczności tych produktów. Zatem badania przeprowadzone w ramach opiniowanej rozprawy mają charakter zarówno poznawczy jak i aplikacyjny. Przedłożona rozprawa wnosi do nauki o żywności istotne i nowatorskie elementy poszerzające dotychczasową wiedzę na temat profilu związków lotnych olejów, które stanowią oryginalny wkład do dziedziny nauk rolniczych i dyscypliny technologii żywności i żywienia.

Przedstawiona do recenzji praca dowodzi wysokich umiejętności analitycznych Autorki, umiejętności radzenia sobie z problemami metodycznymi, a dodatkowo wskazuje na szeroką wiedzę w prezentowanym temacie. Autorka wykazała się biegłością w prowadzeniu doświadczeń naukowych, również umiejętnością analizowania uzyskanych wyników oraz wnioskowania. Należy jasno podkreślić, że przedstawione w recenzji krytyczne uwagi i spostrzeżenia miały w znacznej mierze na celu doskonalenie „warsztatu" naukowo–badawczego Autorki.

Reasumując stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Anny Gacy pt. „Ocena przydatności profilowania związków lotnych do monitorowania jakości olejów tłoczonych na zimno" spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Tekst jedn.: Dz.U. z 2014 r. poz. 1852 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologii Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Gacy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Wroniak