Warszawa, 8.05.2022 r.

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

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Bąkowskiej
pt.: „**Koloidy asocjacyjne i ich rola w procesie autooksydacji oleju rzepakowego w obecności natywnych związków fenolowych**”
wykonanej w Katedrze Biochemii i Analizy Żywności,
Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu,
pod kierunkiem Pana Prof. UPP dr hab. Krzysztofa Dwieckiego

Podstawą sporządzenia recenzji jest pismo z dnia 09.03.2022 r. prof. UPP dr hab. Bożeny Danyluk informujące o uchwale Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 17 lutego 2022 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 mgr inż. Ewy Bąkowskiej skupia się na badaniu koloidów asocjacyjnych i ich oddziaływań z wybranymi związkami fenolowymi oraz na ocenie wpływu struktur koloidalnych na autooksydację lipidów i efektywność działania przeciwutleniaczy w oleju rzepakowym. Proces utleniania lipidów jest jedną z głównych przyczyn pogarszania jakości żywności, prowadzi do tworzenia nieprzyjemnego smaku i zapachu, do utraty wartości odżywczych, a nawet powstawania produktów potencjalnie toksycznych. W diecie największe znaczenie mają nienasycone kwasy tłuszczowe: kwas oleinowy, a szczególnie niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (linolowy i linolenowy). Wraz ze wzrostem nienasycenia kwasów tłuszczowych rośnie tempo ich utleniania. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe są związkami bardzo niestabilnymi, najbardziej podatnymi na utlenianie, co stanowi problem zarówno w produkcji i przechowywaniu żywności, jak również dla zdrowia człowieka. Ochrona lipidów staje się więc jednym z głównych wyzwań dla badaczy i dla przemysłu spożywczego. Okazuję się, że rozpatrując proces utleniania lipidów nie wystarczy skupić się na mechanizmach chemicznych, lecz również należy uwzględnić lokalizację cząsteczek biorących udział w reakcjach utleniania w przestrzeni. Koloidy asocjacyjne są to struktury formowane przez związki powierzchniowo czynne w środowisku niepolarnym, w obecności niewielkiej ilości wody. Mogą one wpływać na efektywność działania przeciwutleniaczy, ponieważ ich aktywność uzależniona jest od lokalizacji w heterogenicznej matrycy produktu spożywczego, w tym przypadku oleju. Oleje roślinne składają się przede wszystkim z triacyloglicerolі, ale także z wielu składników śladowych takich jak: wolne kwasy tłuszczowe, mono- i diacyloglicerole, fosfolipidy czy sterole. Są to związki

o charakterze amfifilowym, tj. są zdolne do gromadzenia się na granicy faz olej-woda i obniżania napięcia powierzchniowego. W oleju występują również niewielkie ilości wody, dlatego związki te tworzą w nich przede wszystkim odwrócone micele, w których hydrofilowe grupy polarne cząsteczek amfifilowych zorientowane są w kierunku fazy wodnej a hydrofobowe w kierunku fazy olejowej. Odwrócone micele uważane są za aktywne centra utleniania. Stąd też tak ważne jest dokładne zrozumienie mechanizmów utleniania lipidów w kontekście odwróconych micel i powstałego środowiska na granicy faz olej-woda. Może to mieć praktyczne znaczenie, przy opracowaniu nowatorskich metod zapobiegania czy kontrolowania utleniania lipidów w żywności.

W mojej opinii jak najbardziej uzasadnione jest podejmowanie tego typu badań. Uważam zatem wybór tematu, zakresu badań i materiału badanego niniejszej pracy za bardzo trafny i aktualny, szczególnie w dobie dbania o wysoką jakość i bezpieczeństwo zdrowotne żywności.

Struktura pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Ewy Bąkowskiej ma nowoczesną formę opracowania składającego się z omówienia wyników badań wcześniej opublikowanych w 4 anglojęzycznych publikacjach (wydanych przez renomowane wydawnictwa), stanowiących monotematyczny cykl, w którym Doktorantka jest pierwszym autorem. Prace zostały przygotowane we współautorstwie, przy czym zawarte w dokumentacji oświadczenia współautorów pozwalają na określenie indywidualnego wkładu Doktorantki w powstanie rozprawy. Należy dodać, że w realizacji prac nad kompleksowym rozwiązaniem zagadnienia, szczególnie w naukach przyrodniczych, praca zespołowa jest istotnym warunkiem osiągnięcia wartości dodanej. Publikacje stanowiące pracę doktorską ukazały się w latach 2019-2022 i obejmują następujące pozycje:

1. Rokosik E., Dwiecki K., Rudzińska M., Siger, A., Polewski K. Column chromatography as a method for minor components removal from rapeseed oil. Grasas y Aceites, 2019, 70 (3), e316. DOI:10.3989/gya.0709182. IF = 1,140; MEiN 2021: 40 pkt.
2. Rokosik E., Siger A., Rudzińska M., Siejak P., Dwiecki K. Formation of phospholipid association colloids in rapeseed oil and their effect on lipid autoxidation in the presence of sinapic and ferulic acid. European Journal of Lipid Science and Technology, 2020, 122, 1900243. DOI:10.1002/ejlt.201900243. IF = 2,679; MEiN 2021: 100 pkt
3. Rokosik E., Siger A., Rudzińska M., Dwiecki K. Antioxidant activity and synergism of canolol and α-tocopherol in rapeseed oil is affected by the presence of phospholipid association colloids. LWT - Food Science and Technology, 2020, 133, 110095. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110095. IF = 4,952; MEiN 2021: 100 pkt
4. Bąkowska E., Siger A., Rudzińska M., Dwiecki K. Water content, critical micelle concentration of phospholipids and formation of association colloids as factors influencing autoxidation of rapeseed oil. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102, 488-495. DOI: 10.1002/jsfa.11376. IF = 3,639; MEiN 2021: 100 pkt.

Należy podkreślić bardzo wysokie wartości wskaźników bibliometrycznych wymienionych wyżej prac. Sumaryczny wskaźnik IF tych publikacji wynosi 12,409, a punktacja według MEiN 2021 - 340 pkt. Prace charakteryzują się wysokim poziomem merytorycznym, staranną redakcją i formą prezentacji wyników, co jest zrozumiałe ze względu na wysokie wymagania wydawnictw odnośnie poziomu merytorycznego i edycji publikacji oraz surowe procedury recenzowania.

Integralną częścią rozprawy mgr inż. Ewy Bąkowskiej pod wspólnym tytułem „Koloidy asocjacyjne i ich rola w procesie autooksydacji oleju rzepakowego w obecności natywnych związków fenolowych" jest 99 stronicowe opracowanie (z aneksem, załączonymi kopiami publikacji i oświadczeniami współautorów stanowiące w sumie 139 stron). Opracowanie obejmuje następujące rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, wykaz publikacji stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej, wykaz symboli i skrótów, wprowadzenie (18 stron), hipotezy badawcze, cel nadrzędny i cele szczegółowe rozprawy, organizację badań, materiał badany, metody badawcze, wyniki badań (42 strony), podsumowanie cyklu publikacji (3 strony), wnioski (1 strona), bibliografię (7 stron), aneks (6 stron). Bibliografia zawiera 84 pozycje literaturowe. Warto podkreślić, że wykorzystane piśmiennictwo jest anglojęzyczne (98%), a prace pochodzące z ostatniej dekady stanowią aż 80%. Opracowanie zostało przygotowane bardzo starannie, napisane jest poprawną polszczyzną i w zasadzie nie zawiera usterek redakcyjnych.

W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim.

Ocena merytoryczna pracy

Wprowadzenie zostało ujęte przez Autorkę w pięć podrozdziałów. Na podkreślenie zasługuje bardzo aktualna, bogata i anglojęzyczna baza literaturowa, na podstawie, której Autorka opisała następujące zagadnienia: charakterystyka oleju rzepakowego, mechanizm procesu utleniania lipidów, charakterystyka koloidów asocjacyjnych, wpływ składników śladowych oleju na tworzenie koloidów asocjacyjnych (monoacyloglicerole i diacyloglicerole, wolne kwasy tłuszczowe, sterole, fosfolipidy, woda, barwniki i metale przejściowe, przeciwutleniacze – tokoferole, tokotrienole i polifenole) oraz wpływ koloidów asocjacyjnych na właściwości antyoksydacyjne przeciwutleniaczy.

W tym miejscu mam pytania: 1) na str. 22 jest informacja o zawartości wody w olejach: „W olejach rafinowanych jest to około 300 ppm, natomiast w olejach tłoczonych na zimno około 900 ppm. Woda w oleju pochodzi z nasion lub jest posiadłością po procesie rafinacji." Proszę wyjaśnić z czego wynika obecność wody w olejach rafinowanych, który z etapów rafinacji jest za to odpowiedzialny? Jaki jest zakres zawartości wody w olejach rafinowanych? Ile jest wody w olejach tłoczonych z nasion? a ile w nierafinowanej oliwie z oliwek? 2) Proszę wyjaśnić, dlaczego Autorka używa określenia chlorofil, tj. w l. pojedynczej, zamiast mnogiej? są chlorofile: a i b, poza tym w olejach mamy do czynienia z pochodnymi chlorofili, głównie z feofityną a. 3) Proszę wyjaśnić, dlaczego zielony kolor oleju jest nieakceptowalny przez konsumentów? Zielona jest oliwa z oliwek, olej konopny, czy dyniowy?

W kolejnym rozdziale Autorka sformułowała 4 hipotezy badawcze tj.: 1. Powstające w oleju rzepakowym fosfatydylocholinowe koloidy asocjacyjne przyspieszają proces autooksydacji lipidów. 2. Kwasy fenolowe oddziałują z fosfatydylocholinowymi koloidami asocjacyjnymi a ich antyoksydacyjne działanie zależy od obecności struktur micelarnych. 3. Koloidy asocjacyjne wpływają na skuteczność przeciwutleniającą canololu i α-tokoferolu oraz ich synergistyczny efekt

antyoksydacyjny w oleju rzepakowym. 4. Na formowanie koloidów asocjacyjnych oraz proces utleniania oleju rzepakowego wpływają: zawartość wody w oleju oraz stężenie substancji amfifilowych, w tym amfifilowych produktów utleniania lipidów. Następnie Autorka podała cel nadrzędny i podporządkowane mu cele szczegółowe, które w pełni odpowiadają tematowi pracy. Cele te zostały zrealizowane w trzech etapach wymienionych w następnym rozdziale, którym odpowiadają kolejno cztery publikacje. Przedstawiony czytelny schemat organizacji doświadczeń z podziałem na te etapy wskazuje na konsekwencję Autorki w podejmowaniu kolejnych badań, które są powiązane z wynikami przeprowadzonych wcześniej eksperymentów. Materiał badany tj. rafinowany olej rzepakowy został krótko zdawkowo opisany, metody badań natomiast bardzo wyczerpująco scharakteryzowane m.in. oczyszczanie oleju z składników śladowych i metody sprawdzenia efektywności oczyszczania (oznaczenie zawartości tokoferoli, steroli - wolnych i zestryfikowanych, barwników chlorofilowych, karotenoidowych, liczby nadtlenkowej, liczby kwasowej, zawartości wody), oznaczenie krytycznego stężenia micelizacji fosfatydylocholiny, pomiary fluorescencji stacjonarnej oraz anizotropii fluorescencji, pomiar czasu życia fluorescencji sondy NBD-PE, przygotowanie prób do eksperymentu przyspieszonego utleniania, oznaczenie stężenia pierwotnych i wtórnych produktów utleniania – odpowiednio wodoronadtlenków lipidów i heksanalu, analiza zjawiska synergizmu między canololem a α-tokoferolem i w końcu analiza statystyczna.

Układ poszczególnych doświadczeń, sekwencja analiz z wykorzystaniem nowoczesnych analiz instrumentalnych, statystyczne opracowanie wyników wskazują na oryginalne podejście Autorki do rozwiązywanego problemu badawczego. Podjęte badania wymagały zastosowania różnorodnych metod: fizycznych, chemicznych, instrumentalnych i wskazują na opanowanie warsztatu badawczego przez Doktorantkę. Należy podkreślić, że jest niewiele doniesień dotyczących tematyki koloidów asocjacyjnych i oceniany cykl publikacji stanowi ważny wkład do literatury naukowej w tym zakresie.

W kolejnym rozdziale Autorka szczegółowo opisała najważniejsze wyniki przeprowadzonych doświadczeń. Najpierw Autorka streściła badania dotyczące oczyszczenia oleju rzepakowego ze związków towarzyszących przy użyciu chromatografii kolumnowej (temu poświęcona była publikacja P1). Po serii badań Autorka stwierdziła, że nie ma jednego uniwersalnego złoża, które byłoby w stanie usunąć wszystkie składniki śladowe z oleju. Dopiero zastosowanie trzech kolumn i adsorbentów takich jak: kwas krzemowy, węgiel aktywny, tlenek glinu oraz żel krzemionkowy pozwoliło oczyścić olej rzepakowy ze steroli, tokoferoli i barwników do minimalnego ich stężenia, nie wpływając przy tym negatywnie na jakość oleju. W kolejnym etapie dodając fosfatydylocholinę utworzono koloidy asocjacyjne, wyznaczając krytyczne stężenie micelizacji, które wynosiło 51,13 μmol/kg oleju. Zajęto się charakterystyką koloidów asocjacyjnych oraz ich oddziaływaniem z kwasem sinapowym i ferulowym. Temu etapowi poświęcona została kolejna publikacja P2. Potwierdzeniem wbudowywania się kwasów fenolowych w struktury micel DOPC było powstanie statycznego

kompleksu pomiędzy sondą NBD-PE a kwasami fenolowymi, obserwowanego na podstawie analizy czasu życia fluorescencji sondy i wartości stałej szybkości wygaszania fluorescencji.

W kolejnym kroku (tj. w publikacji P3) ustalono oddziaływania canololu i α-tokoferolu z odwróconymi micelami. Ponadto określono ich aktywność antyoksydacyjną, a także zjawisko synergizmu w odniesieniu do procesu autooksydacji oleju rzepakowego w obecności koloidów asocjacyjnych. Oddziaływania przeciwutleniaczy z koloidami asocjacyjnymi określono na podstawie zmian natężenia fluorescencji i anizotropii fluorescencji sondy NBD-PE, jak również zmian emisji fluorescencji samych antyoksydantów (publikacja P2 i P3). Innowacyjność tych badań polegała na wykorzystaniu dwóch przeciwutleniaczy różniących się względem siebie polarnością, a także określeniu ich synergistycznego oddziaływania w micelach. Odnotowano, że canolol został włączony do struktury odwróconych micel, ale nie występował w ich hydrofilowej części, był zdolny do gromadzenia się na granicy faz olej-woda, tworząc struktury micelarne. Natomiast α-tokoferol tworzył struktury koloidalne, migrując na granicę faz olej-woda, jednak nie oddziaływał z fosfolipidami i nie wbudował się w utworzone struktury micelarne.

W następnym etapie badań (zarówno publikacja P2 i P3) oczyszczony olej rzepakowy w obecności odwróconych micel oraz badanych wyżej przeciwutleniaczy poddano przyspieszonemu utlenianiu w temp. 55°C, określając tworzenie się wodoronadtlenków lipidów oraz heksanalu. W eksperymencie tym potwierdzono prooksydacyjne działanie koloidów asocjacyjnych, których obecność przyspiesza proces rozkładu pierwotnych produktów utleniania do wtórnych. Potwierdziła to analiza PCA, wskazując, że głównym produktem utleniania w przypadku braku koloidów asocjacyjnych były wodoronadtlenki, natomiast w ich obecności był to heksanal. Zauważono, że ten ostatni można traktować jako przydatny marker kontroli procesu autooksydacji w obecności koloidów asocjacyjnych.

W ostatnim etapie badań tj. w publikacji P4 przeanalizowano wpływ zmian zawartości wody i produktów utleniania na krytyczne stężenie micelizacji w próbach oleju rzepakowego o dwóch wilgotnościach 220 i 700 mg/kg podczas przyspieszonego utleniania. Było to uzasadnione, ponieważ dokładny mechanizm utleniania w olejach roślinnych, biorąc pod uwagę aspekty fizyczne, w tym rolę koloidów asocjacyjnych, nie jest w pełni poznany. Okazało się, że szybkość procesu utleniania oleju rzepakowego była zależna od początkowej zawartości wody i obecności odwróconych micel. Natomiast zmiany w strukturze odwróconych micel były zależne od powiązanych ze sobą czynników tj.: początkowa zawartość wody w oleju, zmiany zawartości wody, stężenie substancji amfifilowych oraz powstawanie produktów utleniania lipidów.

Wyniki uzyskanych badań Autorka podsumowała w kolejnym rozdziale rozprawy formułując liczne obszerne, ale przejrzyste stwierdzenia i wnioski, które świadczą o zrealizowaniu celów szczegółowych i celu nadrzędnego, zatem wskazują na pełną realizację zaplanowanych badań. Postawione na początku 4 hipotezy badawcze zostały pozytywnie zweryfikowane. Ostatni

najważniejszy rozdział pt. Wnioski, w skrócie jeszcze raz powtarza, ale i systematyzuje wiedzę pozyskaną na podstawie badań przeprowadzonych w ramach tej rozprawy.

Z obowiązku recenzenta wskazuję poniżej zagadnienia wymagające dyskusji:

1) Czy istnieje możliwość zobaczenia, zmierzenia takiej nanoemulsji, jaką są oleje jadalne? Czy można określić ilość i wielkość odwróconych micel? Czy rozważano w pracy takie badania?
2) Jakie są możliwości praktycznego wykorzystania pozyskanej w toku badań wiedzy o koloidach asocjacyjnych? Czy można przewidzieć trwałość handlowego oleju rzepakowego na podstawie zbadania zawartości wody i pozostałości fosfolipidów?
3) Jak Autorka, na podstawie literatury i wyników badań własnych, wyjaśni fenomen wysokiej stabilności oliwy z oliwek virgin – stosunkowo dużo wody, w porównaniu do oliwy rafinowanej (mało wody)?

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Ewy Bąkowskiej dostarcza wartościowych, oryginalnych wyników badań dotyczących koloidów asocjacyjnych i ich oddziaływań ze związkami fenolowymi oraz wpływu struktur koloidalnych na autooksydację lipidów i efektywność działania przeciwutleniaczy. Praktykom przedstawia możliwość skutecznego hamowania procesu autooksydacji oleju rzepakowego przez dodatek przeciwutleniaczy, w tym związków fenolowych. Badania przeprowadzone w ramach opiniowanej rozprawy są innowacyjne, mają charakter zarówno poznawczy jak i aplikacyjny. Przedłożona rozprawa wnosi do nauki o żywności istotne i nowatorskie elementy poszerzające dotychczasową wiedzę na temat roli koloidów asocjacyjnych w utlenianiu olejów jadalnych, 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. Reasumując stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Ewy Bąkowskiej pt. „Koloidy asocjacyjne i ich rola w procesie autooksydacji oleju rzepakowego w obecności natywnych związków fenolowych" 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 i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologii Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie pracy i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Bąkowskiej.

Małgorzata Wroniak