

Dr hab. inż. Wioletta Błaszczak, prof. nadzw.
Instytutu Rozrodu i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Olsztyn, 20.08.2015

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Beaty Roszkowskiej pt.: „Doskonalenie metody otrzymywania oleju z nasion dyni z uwzględnieniem wydajności procesu i jakości produktu końcowego”, wykonanej w Katedrze Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem dr hab. inż. Iwony Konopka, prof. UWM.

Współczesna nauka o żywności coraz częściej musi reagować na zmiany wymagań konsumentów, dotyczących nie tylko bezpieczeństwa żywności ale przede wszystkim wartości odżywczej i właściwości prozdrowotnych produktów spożywczych. Biooleje roślinne mają liczne, udokumentowane naukowo oddziaływania na fizjologię człowieka. Do ich wydobycia teoretycznie można wykorzystać wszystkie typowe technologie, stosowane w przemyśle olejarskim (tłoczenie, ekstrakcję, metody kombinowane). Jednak zwracając uwagę na bogactwo składników bioaktywnych i ich wysoką termolabilność, podatność na utlenianie czy inne sposoby degradacji chemicznej, pod wpływem czynników zewnętrznych, wybór odpowiedniej technologii wymaga rzetelnego przystosowania parametrów procesu i/lub zastosowania pewnych modyfikacji nie tylko na etapie pozyskiwania oleju ale także jego oczyszczania (rafinacji).

Główne zainteresowanie Autorki to biooleje otrzymywane z nasion dyni polskich odmian i rodów, sposób ich otrzymywania (typ i sposób ekstrakcji), zawartość składników bioaktywnych, ich charakterystyka i trwałość.

Temat pracy wybrany został w oparciu o analizę piśmiennictwa i potrzeby niewielkich zakładów przetwórczych polskiego przemysłu olejarskiego, a do jego realizacji wykorzystano odpowiednie metody analityczne.

Już na wstępie recenzji muszę zaznaczyć bardzo dobrą szatę graficzną pracy. Praca liczy łącznie 127 stron maszynopisu, w tym 24 tabele i 57 rysunków. Na pracę składa się wstęp wraz z przeglądem piśmiennictwa, zawarty na 29 stronach, hipoteza

robocza, metodyka badań, która obejmuje 11 stron, dyskusja i omówienie wyników licząca 43 strony, wnioski oraz bibliografia, składająca się ze 191 pozycji oryginalnych, 14 norm polskich i międzynarodowych oraz 9 stron internetowych. Należy zaznaczyć, że zacytowano 149 pozycji z czasopism zagranicznych, w tym 35 pozycji z lat 2006-2010 i 48 pozycji z lat 2011- 2015. Polskie publikacje z tych lat liczyły odpowiednio 19 i 9 pozycji. Wskazuje to na fakt, że istnieje duże zainteresowanie do studiów nad tym zagadnieniem; a Autorka jest dobrze obeznana z dotychczas uzyskanymi wynikami w Polsce i na świecie.

Autorka charakteryzuje w pracy główne gatunki dyni uprawianych na świecie, tj. dynia piżmowa, olbrzymia, figolistna, „ayote”, czy dynia zwyczajna. Podaje przy tym produkcję dyni na świecie i w Polsce, wykazując, że Polska stanowi 0,2% udziału w produkcji światowej. Według Autorki w Polsce uprawia się głównie odmiany dyni olbrzymiej i zwyczajnej. Podaje również ekonomiczne aspekty uprawy i przetwórstwa dyni w tym wydajność z hektara- 7000 sztuk, z których uzyskuje się 400-700 kg nasion, a z nich 120-180 L oleju.

Doktorantka scharakteryzowała najważniejsze związki bioaktywne owoców dyni takie jak: polisacharydy, kwas para-aminobenzoesowy czy γ -aminomasłowy, sterole, białka i peptydy. Szczegółowo scharakteryzowano także właściwości prozdrowotne dyni np.: aktywność hipoglikemiczna, przeciwnowotworowa, i przeciwmutagenna, przeciwdobnoustrojowa, chipocholesterolemiczna i przeciwutleniająca, immunomodulacyjna, przeciw pasożytnicza czy zdolność do hamowania tworzenia kamieni nerkowych. Warto dodać, że przedstawione w pracy dane literaturowe w pełni potwierdzają właściwości lecznicze owoców/ nasion dyni zarówno w aspekcie *in vitro* jak i *in vivo*. Fakt, że wspomniane badania prowadzone były wyłącznie zagranicą oraz brak, w tym zakresie, wyników badań krajowych (lub nie zostały zacytowane) stwarza możliwość prowadzenia interesujących/ nowych badań nad polskimi odmianami dyni i ich właściwościami funkcjonalnymi. Ponadto, wskazano, że procesy technologiczne (kiełkowanie lub fermentacja) stosowane w przetwórstwie nasion dyni nie tylko istotnie wpływają na zawartość, rozpuszczalność/ ekstraktywność i właściwości funkcjonalne składników bioaktywnych ale także ograniczają udział/ oddziaływanie takich związków jak fityniany, szczawiany, azotany, taniny czy inhibitory tripsyny. Doktorantka zwraca uwagę na fakt, że najcenniejsza ze względów odżywczych i prozdrowotnych jest frakcja lipofilna nasion dyni. Stąd, wiedza na temat charakterystyki i rozmieszczenia składników lipidowych w tkankach

roślinnych/ nasionach może w bezpośredni sposób decydować o sposobie wydobycia tej frakcji tj. o wydajności i jakości oleju.

Struktura a ekstraktywność lipidów. Dla pracy to jeden z najważniejszych rozdziałów. Podrozdział 8.1., traktuje o budowie i możliwościach ściany komórkowej. Doktorantka szczegółowo przedstawiła budowę ściany komórkowej z uwzględnieniem najważniejszych jej organelli jak i budujących ją polisacharydów (celuloza, hemiceluloza, pektyna). Natomiast podrozdział 8.1.1. przedstawia możliwości degradacji ściany komórkowej. Jest on kluczowy, biorąc pod uwagę fakt, że wymienione w pracy elementy strukturalne ścian komórkowych ograniczają ekstraktywność związków z komórek i organelli. Autorka pracy wymieniła i scharakteryzowała enzymy hydrolizujące poszczególne składniki ścian komórkowych tj. celulozy, hemicelulozy i pektyny. Te ostatnie są degradowane przez złożony układ enzymów (hydrolazy, liazy, esterazy), którego mechanizm Autorka wyjaśnia.

W dalszym ciągu przeglądu piśmiennictwa opisane zostały białka decydujące o trwałości i/lub stabilności oleosomów. Wadą tego rozdziału jest oparcie go na informacjach i rysunkach zaczerpniętych wyłącznie z Internetu.

Opisano budowę oleozyn, tj. małych białek o masie 16-24 kDa, zwracając uwagę, na obecność długiej (ok. 70 reszt AA) hydrofobowej domeny specjalnej, zawieszanej w matrycy triacylogliceroli (TAG). Natomiast domeny polarne zakotwiczone są w błonie oleosomu i skierowane w stronę cytozolu. Zwrócono uwagę na fakt, dlaczego oleosomy w komórce nie podlegają koalescencji, wyjaśniając to zjawisko interakcyjnym oddziaływaniem molekuł kwasów tłuszczowych i ujemnie naładowanych frakcji fosfolipidów (fosfatydyloinozytolu i fosfatydyloseryny). Podano również sekwencję przykładowej oleozyny, zwracając uwagę, że białko to stanowi od 2 do 8% białka nasion oleistych oraz wskazano na związek między oleozyną a triacyloglicerolem i rozmiarami oleosomów (stosunek oleozyny do TAG jest odwrotnie proporcjonalny do rozmiarów oleosomów). Wspomniano również o innych białkach związanych z powierzchnią oleosomów tj. kaleozynami i steroleozynami i porównano ich budowę.

Kolejny rozdział (9), traktuje o podstawowych metodach wydobywania tłuszczu, stanowiąc podłoże do dyskusji w dalszej części pracy. Poczynając od standardowego tłoczenia, Autorka stara się podkreślić wpływ parametrów tego procesu nie tylko na wydajność lecz także na aktywność biologiczną. Opisując ekstrakcję jako kolejny sposób wydobycia oleju, wskazuje na zasady „zielonej

chemii” i korzyści z niej płynące zarówno dla środowiska jak i człowieka. Omawiając czynniki warunkujące przebieg ekstrakcji Doktorantka pisze o matrycy próby, typie ekstrakcji i jej sposobie oraz czynnikach wpływających na ekstrakcję i/ lub ją wspomagających. Autorka zwraca również uwagę na innowacyjne rozwiązania procesowe takie jak: wspomaganie ultradźwiękami bądź mikrofalami, ekstrakcja w punkcie nadkrytycznym lub metody kombinowane. W tej części przeglądu piśmiennictwa Autorka koncentruje się na zastosowaniu procesów enzymatycznych. Podaje Ona przykłady (skład i efekty) zastosowania złożonych koktajli enzymatycznych i uzupełnianiu ich mikrofalowym oddziaływaniem. Ilustruje efekt procesu za pomocą mikrofotografii SEM, które obrazują efekt zastosowanych operacji jednostkowych na mikrostrukturę materiału. Porównuje Ona wydajność pozyskiwania oleju z różnych owoców/ nasion koncentrując się na takich czynnikach jak granulacja surowca, przepływ rozpuszczalnika, ciśnienie, temperatura i typ ekstrakcji/modyfikatora (rozpuszczalnika). Badania dotyczące ukierunkowanego pozyskiwania preparatów bioaktywnych z owoców/ nasion dyni, przedstawione przez Autorkę w tym rozdziale (Podrozdział 9.2.3.) mogą stanowić bezpośrednią bazę do późniejszej dyskusji wyników.

Po obszernym przeglądzie piśmiennictwa Doktorantka stawia następującą hipotezę badawczą: „Technologia wydobycia oleju dyniowego oparta o częściowe enzymatyczne upłynnienie miazgi nasiennej z zastosowaniem preparatów pektynolitycznych, celuloitycznych i proteolitycznych, pozwalana na skuteczne technologicznie wyodrębnienie oleju.”

Podaje również hipotezy cząstkowe, które realizowano, a także zakres badań. Do tej części mam pewne zastrzeżenia, które przedstawię w części uwag merytorycznych/ krytycznych.

Po części dotyczącej hipotezy i zakresu badań Doktorantka przechodzi do sposobu realizacji pracy czyli części doświadczalnej. Podaje 5 etapów doświadczenia tj.: charakterystyka odmian i rodów dyni, charakterystyka jednej z odmian pod względem wydajności uzyskiwanego oleju, optymalizacja wydajności (dobór stężeń preparatów enzymatycznych i ich kombinacja, w tym wpływ czynników takich jak temperatura, pH, i czas według modelu Box-Behnken'a).

W analizie uzyskanych olejów zastosowano 11 testów analitycznych z techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej, chromatografii gazowej ze spektrometrią mas, chromatografii cienkowarstwowej oraz liczb charakterystycznych. Jako olej

porównawczy zastosowano handlowy olej dyniowy produkcji zakładu Szarłat z Łomży. Określono również skład osadu pozostałego po odolejeniu. Bardzo szczegółowo i klarownie opisano metody analityczne zastosowane w pracy str. 55-61.

Omówienie i Dyskusję wyników Autorka rozpoczyna od podstawowej charakterystyki składu chemicznego badanych odmian i rodów dyni, tj. zawartości i składu kwasów tłuszczowych, białek, błonnika pokarmowego i jego frakcji oraz składników mineralnych. Stwierdza znaczne zróżnicowanie badanych wyróżników w ramach odmian i rodów wiążąc to m. in. z warunkami uprawy oraz stanu dojrzałości nasion. Stwierdzono, że wśród badanych odmian najwyższą zawartością tłuszczu 49,6% charakteryzowała się odmiana Herakles, która wykorzystano w dalszej części pracy. Wszystkie wymienione nietłuszczowe składniki nasion dyni będą istotne w analizie i sposobie wykorzystania produktu odpadowego przy produkcji oleju z dyni metoda kombinowaną.

Po określeniu korelacji wyróżników (sucha masa, białko oraz dodatkowo kwasu linolowego z linolenowym) ponownie okazało się, że najbardziej obiecujące są nasiona odmiany Herakles. Dla nasion tej odmiany określono zatem wydajność oleju przy zastosowaniu metody tłoczenia, oraz trzema metodami ekstrakcji z zastosowaniem różnych rozpuszczalników i maceracją enzymatyczną. Najwyższa uzyskana wydajność wyniosła blisko 50%.

Kolejnym etapem pracy była optymalizacja, dla wytypowanej odmiany, procesu wydobycia oleju z zastosowaniem enzymów. Zastosowano zmienny skład preparatów enzymatycznych i jego udziału w stosunku do masy nasion. Autorka stwierdziła, że zastosowanie trójskładnikowego preparatu enzymatycznego jest porównywalne z klasycznymi procedurami. Bardzo interesującym, zwłaszcza dla małych i średnich przedsiębiorstw, okazała się kalkulacja ekonomiczna i wykazanie możliwości poprawy ekonomicznych efektów tego procesu. Jednakże, jak stwierdza Doktorantka, niezbędne dla uzyskania celu będzie przedłużenie czasu maceracji nasion. Według przedstawionego równania optymalny czas wynosi 12-15h. Dodatkowo, dążąc do obniżenia kosztów, sprawdzono możliwość podwyższenia wydajności procesu przy najniższej badanej dawce preparatu – 2%. Wyniki badań optymalizacyjnych przedstawiono na str. 78-90 w postaci 8 tabel i 9 rysunków. Opracowano funkcje zależności wydajności procesu pozyskiwania oleju od temperatury, pH i czasu maceracji. Sprawdzono również istotność współczynników

równania a w analizie wariancji wykazano, że największy wpływ na ilość uzyskanego oleju (71%) miało pH maceracji, a najmniejszy temperatura. Optymalizacja zakończyła się powodzeniem, bowiem udało się uzyskać dla 2% dodatku kombinacji enzymów proteolitycznych, pektynolitycznych i celulolitycznych, porównywalne wydajności oleju z 6% dawką tych enzymów.

Autorka wykorzystwała również metody mikroskopowe dla zobrazowania zmian struktur komórkowych (SEM i konfokalny), chociaż zabrakło mi w tej części oznaczeń poszczególnych elementów/składników komórki (Rys.48).

Kolejne dwa rozdziały pracy to charakterystyka olejów z nasion dyni oraz ocena preparatu będącego pozostałością po odolejaniu. W pierwszym z nich Doktorantka porównuje skład olejów otrzymanych różnymi metodami. Jako próbę odniesienia przyjmuje Ona olej handlowy. Dużą różnicę w składzie oleju handlowego w porównaniu z użytą w pracy odmianą Herakles tłumaczy wieloma czynnikami m.in. warunkami uprawy, zmiennością temperatury itp. Porównując metody porównywania oleju Autorka konstatuje, że zastosowanie maceracji enzymatycznej miazgi powoduje, że skład kwasów tłuszczowych jest zbliżony do otrzymanych dla procesów ekstrakcji.

Analizując bioaktywne składniki oleju z dyni stwierdzono, że maceracja miazgi z kompleksem enzymatycznym pozwala na uzyskanie oleju o najwyższej zawartości tokoferoli oraz ich poszczególnych frakcji zwłaszcza alfa i beta, które są najlepiej przyswajalne przez organizm człowieka. W grupie karotenoidów, również stwierdzono zróżnicowanie ich zawartości w oleju w zależności od sposobu jego wydobycia. Dla oleju uzyskanego po enzymatycznej maceracji miazgi, uzyskano zawartość w ilości 21 mg/ 100g oleju, co nie odbiegało od wartości dla oleju handlowego, cytowanych przez innych badaczy. Warto w tym miejscu podkreślić, że Doktorantka stwierdziła również występowanie zeaksantyny i 9-cis-Beta karotenu. Sposób wydobycia oleju miał również istotny wpływ na fitosterole, których wysoką zawartość stwierdzono w metodzie z maceracją enzymatyczną. Na podkreślenie zasługuje także dominująca rola spinasterolu i beta –sistosterolu (48-58% ogółu steroli. W analizie skwalenu, jakkolwiek uzyskano wyniki znacznie niższe niż w pracach innych autorów, to jednak wykazano, że maceracja enzymatyczna pozwala na uzyskanie wyższych wartości niż w innych metod wydobycia oleju.

Badając stabilność olejów dyniowych Autorka skupiła się na ich barwie, liczbach charakterystycznych i czasie indukcji. Podkreśliła dużą zmienność badanych

wyróżników, zwłaszcza liczby kwasowej. Zwróciła także uwagę na fakt, że olej po maceracji enzymatycznej cechuje się wartościami badanych wyróżników korzystniejszymi niż oleje ekstrakcyjne. W badaniach początkowych produktów utleniania kwasów tłuszczowych wykazano nieobecność struktur trienowych przy niewielkiej ilości dniów. Badania stabilności oksydacyjnej olejów z dyni pozwoliły na stwierdzenie, że i ten wyróżnik zależy od sposobu wydobycia oleju. Czas indukcji dla oleju tłoczonego oznaczono na 12-15h a najmniejszą trwałością charakteryzował się olej ekstrahowany eterem naftowym. W przypadku oleju po maceracji enzymatycznej wyniósł on 6,50 h i był równy wartości określonej dla oleju handlowego.

Doktorantka kończy omówienie wyników charakterystyką pozostałości po uzyskiwaniu oleju dyniowego wykazując, że białko stanowi decydującą część składu pozostałości a główny jej komponent to gluteliny/kukurbityna (56%) wobec około 20% albumin i globulin. Zwraca jednak uwagę na deficyt w tej frakcji lizyny i aminokwasów siarkowych, co dość znacznie zawężyło możliwość jej zastosowania. Autorka podkreśla znaczną zawartość tłuszczu w pozostałości po wydobyciu -21% i sugeruje dla poprawienia efektywności procesu jej odzyskiwanie przy pomocy tradycyjnych metod ekstrakcji. Jest to jednak odejście od zasad „zielonej chemii”, o której Doktorantka pisze w poprzednich częściach dysertacji.

Pracę kończy 7 wniosków, dość szczegółowych, ale oddających w pełni osiągnięcia pracy.

Zalety pracy:

1. Praca związana jest z krajowym surowcem i może wspomagać działalność małych i średnich przedsiębiorstw poszukujących nowych technologii możliwych do zrealizowania w istniejących warunkach, przy niewielkim nakładzie kosztów.
2. Na uwagę zasługuje staranne przygotowanie do podjęcia badań poprzez przegląd bardzo dużej ilości najnowszego piśmiennictwa. Pozwoliło to na logiczne zaplanowanie problematyki badawczej, postawienie hipotezy roboczej i dobór metod analitycznych.
3. Wszechstronność analityczna i umiejętność interpretacji uzyskanych wyników.

4. Na osobne podkreślenie zasługuje opanowanie statystycznych metod analizy wyników a zwłaszcza optymalizacja procesu z wykorzystaniem modelu Box-Behnkena.
5. Opracowanie technologii wytwarzania oleju z wykorzystaniem enzymatycznej maceracji miazgi.
6. Dostarczenie nowych danych dotyczących właściwości oleju z dyni i charakterystyka czynników decydujących o jego zachowaniu w czasie przechowywania./trwałości oksydacyjnej
7. Kalkulacja warunków opłacalności ekonomicznej proponowanego procesu uzyskiwania oleju z nasion dyni.
8. Charakterystyka pozostałości po procesie produkcji i wskazania możliwości jej praktycznego wykorzystania.

Uwagi krytyczne

1. Zbyt długi tytuł. Z powodzeniem mógłby on brzmieć tak: „Doskonalenie otrzymywania olejów z nasion dyni” – bo przecież jeśli doskonalimy jakiś proces czy technologię to właśnie w celu poprawy jakości (a nie jej pogorszenia) lub/i wydajności procesu.
2. W streszczeniu pisząc o optymalizacji autorka wymieniając parametry procesu optymalne temperatury i czas podaje z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku, co w pewien sposób razi (54, 02° C i 15, 35 godz.) mimo, że wynika to wyliczeń optymalizacji.
3. Podrozdział 1 przedstawiający podział – klasyfikację dyniowatych mógłby być przedstawiony kilkoma zdaniami bez rozrysowania schematów podziału.
4. Rysunek 3 strona 15. Szkoda, że nie podano obok nazw łacińskich ich polskich odpowiedników.
5. Rozdział 3, str. 18- 19 oparty jest wyłącznie na danych z Internetu. Czy jest to jedyne źródło informacji na podany przez Autorkę temat?
6. Ponieważ w pracy dla większości rysunków Autorka używa sformułowania „zaadaptowano” (rys.7, 11, 14, 16, i inne) należało podać na czym polegała ich adaptacja.

7. Rozdział 6, str. 24. Jeśli podaje się wyjaśnienie symbolu TAG wyjaśniając że są to triacyloglicerole, należało również wyjaśnić symbole LLL, OLL, PLL, LOO, i inne (podobnie str. 92) chociażby w spisie symboli.
8. Podrozdział 7.2., str. 27. Rysunek 13. w tym miejscu powinno się poświęcić kilka zdań wyjaśnienia czym różnią się poszczególne zdjęcia, gdyż dla czytelnika nie obeznanego z technikami mikroskopowymi, z zwłaszcza z metodami fluorescencji nie jest to jasne.
9. Podrozdział 8.2. Tabela 5. co oznacza skrót AA? Należałoby podać pełną nazwę i zunifikować sposób definiowania, tj. albo AA albo reszt aminokwasowych (str. 33).
10. Rozdział III. Hipotezy badawcze. Autorka zbyt zawile przedstawiła hipotezę roboczą – użyte w niej sformułowanie „ skuteczne technologicznie” jest znacznie szersze niż sama hipoteza, co zresztą zmusza autorkę do skrupulatnego wyjaśnienia użytego sformułowania.
11. Strona 68. fragment dotyczący przeliczenia zawartości frakcji błonnika (celulozy, hemicelulozy) jest integralną częścią metodyki i powinien się znaleźć właśnie w niej.
12. Strona 89. rysunek 48. Dlaczego nie przedstawiono zdjęć mikrostruktury nasion świeżych i traktowanych enzymatycznie tymi samymi metodami mikroskopowymi. Nie można ocenić wpływu obróbki enzymatycznej przy pomocy mikroskopu konfokalnego jeżeli próbę wyjściową obserwowano w mikroskopie skaningowym. Brak jest również oznaczeń poszczególnych elementów komórki.
13. Ponieważ pracę kończy zagadnienie wykorzystania produktu ubocznego, to wniosek z tego wpływający powinien zostać również zaakcentowany w podsumowaniu badań (Rozdział VI).

Mimo uwag krytycznych, które nie obniżają wysokiej moim zdaniem, wartości przedstawionej mi do recenzji pracy, jeszcze raz podkreślam jej naukowość i użyteczność a także mnogość cennych informacji, wzbogacających wiedzę na temat technologii produkcji oleju z nasion dyni. Rozprawa spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U.Nr 65, poz.595, z późn. zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Proszę zatem Wysoką Radę Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko- Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Beaty Roszkowskiej do dalszej części przewodu doktorskiego, to jest do publicznej obrony pracy.

Jednocześnie mając na uwadze przedstawione wyżej zalety pracy doktorskiej mgr inż. Beaty Roszkowskiej, proszę Wysoką Radę Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie o jej wyróżnienie.

Andrzej Błaszczyk