

Warszawa, dn. 13.12.2022r.

dr hab. Małgorzata Wroniak, prof. SGGW
Zakład Technologii Tłuszczów i Koncentratów Spożywczych
Katedra Technologii i Oceny Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Mikołajczak
pt. "**Zastosowanie pochodnych kwasów fenolowych do stabilizacji bioolejów roślinnych**"
wykonanej w Katedrze Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych,
Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
pod kierunkiem:
dr hab. inż. Małgorzaty Tańskiej, prof. UWM
Promotor pomocniczy:
dr inż. Dorota Ogródowska

Podstawą sporządzenia recenzji jest pismo z dnia 24.10. 2022 r. prof. dr hab. Iwony Konopki z prośbą o ocenę rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Mikołajczak pt. " Zastosowanie pochodnych kwasów fenolowych do stabilizacji bioolejów roślinnych".

Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Mikołajczak skupia się na charakterystyce zawartości i aktywności przeciwutleniającej związków fenolowych w olejach, a szczególnie na ocenie zawartości związków fenolowych naturalnie występujących w bioolejach oraz skuteczności dodatku pochodnych kwasów fenolowych w hamowaniu utleniania oraz ograniczaniu degradacji składników bioaktywnych podczas przechowywania olejów.

Oleje specjalne/farmaceutyczne to oleje roślinne, które otrzymywane są najczęściej przez tłoczenie na zimno lub ekstrakcję CO₂ w stanie nadkrytycznym. Pozyskiwane są z surowców roślinnych charakteryzujących się unikalnym składem kwasów tłuszczowych i/lub składników bioaktywnych. Kwasy tłuszczowe, w szczególności nienasycone, odgrywają ważną rolę w zapewnieniu prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka, jednakże ich stosunkowo wysoki udział w olejach roślinnych stanowi przyczynę niskiej trwałości przechowalniczej tych produktów. Lipidy w żywności podlegają różnym procesom utleniania, m.in. utlenianiu fotosensybilizowanemu, autooksydacji i utlenianiu enzymatycznemu. Szybkość reakcji utleniania zwiększa się wraz ze stopniem nienasycenia kwasów tłuszczowych i jest determinowana m.in. obecnością światła, tlenu, wody, pro- i przeciwutleniaczy, enzymów, temperatury. Efektem tych procesów jest powstawanie pierwotnych produktów utleniania - wodoronadtlenków, które następnie przekształcane są we wtórne produkty, m.in. aldehydy, ketony, polimery o negatywnym wpływie na cechy fizyczne i sensoryczne żywności. Dochodzi do obniżenia zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych, ale także do powstania wiązań między produktami utleniania a innymi składnikami żywności np. białkami, witaminami, co w konsekwencji przekłada się na obniżenie wartości

żywnościowej produktów spożywczych. Dodatek syntetycznych przeciwutleniaczy tj. BHT, BHA, PG czy TBHQ jest dyskusyjny ze względu na bezpieczeństwo zdrowotne. Dlatego poszukuje się związków naturalnych, które zwiększają nie tylko stabilność oksydacyjną, ale także wartość odżywczą produktów spożywczych. Szczególną uwagę zwraca się na związki fenolowe - wtórne metabolity roślin. Badania wykazały, że właściwości przeciwutleniające kwasów fenolowych są związane z ich budową chemiczną. W związkach z jedną grupą hydroksylową aktywność przeciwutleniająca wzrasta wraz z dodatkową obecnością jednej lub dwóch grup metoksyłowych, podobnie jak podstawienie w pierścieniu w pozycji orto- grupy z donorem elektronowym, grupy alkilowej czy metoksyłowej. W ostatnich latach zwrócono szczególną uwagę na winylowe pochodne kwasów fenolowych tj. 4-winylosyringol i 4-winylogwajakol, które powstają w wyniku dekarboksylacji odpowiednio kwasu sinapowego oraz ferulowego, i wykazują wysoką zdolność do zmiatania wolnych rodników, a to daje możliwość wykorzystania ich do podwyższania stabilności oksydacyjnej olejów jadalnych.

W mojej opinii jak najbardziej uzasadnione jest podejmowanie tego typu badań. Uważam wybór tematu i zakresu badań niniejszej pracy doktorskiej za trafny i bardzo aktualny, szczególnie w dobie poszukiwania nowych, naturalnych dodatków do żywności o właściwościach przeciwutleniających w celu zapewnienia wysokiej jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego żywności.

Struktura pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Natalii Mikołajczak ma nowoczesną formę opracowania, składającego się z omówienia wyników badań wcześniej opublikowanych w 4 anglojęzycznych publikacjach, stanowiących monotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem „Zastosowanie pochodnych kwasów fenolowych do stabilizacji bioolejów roślinnych”. Prace zostały wydane przez renomowane wydawnictwa tj. Food Chemistry, Trends in Food Science & Technology, NFS Journal i ukazały się w latach 2019-2022. Prace zostały przygotowane we współautorstwie, jednak Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji. Zawarte w dostarczonej dokumentacji oświadczenia współautorów pozwalają na określenie indywidualnego wkładu Doktorantki w ich powstanie na poziomie od 65 do 80%. Należy dodać, że w realizacji prac nad kompleksowym rozwiązaniem danego problemu badawczego, szczególnie w naukach przyrodniczych, praca zespołowa jest istotnym warunkiem osiągnięcia wartości dodanej.

Publikacje stanowiące pracę doktorską i obejmują następujące pozycje:

P1. Mikołajczak N., Tańska M., Ogrodowska D., 2021, Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability, Trends in Food Science & Technology, 113, 110–138, IF = 12,563; MEiN2021 = 200 pkt. - udział Doktorantki 75%.

P2. Mikołajczak N., Tańska M., 2022, Effect of initial quality and bioactive compounds content in cold-pressed flaxseed oils on oxidative stability and oxidation products formation during one-month

storage with light exposure, NFS Journal, 26, 10–21, IF = 3,111; MEiN2022 = 140 pkt. udział Doktorantki 80%.

P3. Mikołajczak N., Tańska M., Ogrodowska D., Czaplicki S., 2022, Efficacy of canolol and guaiacol in the protection of cold-pressed oils being a dietary source linoleic acid against oxidative deterioration, Food Chemistry, 393, 133390, IF = 7,514; MEiN2022 = 200 pkt. udział Doktorantki 65%.

P4. Mikołajczak N., Tańska M., Konopka I., 2019, Impact of the addition of 4-vinyl derivatives of ferulic and sinapic acids on retention of fatty acids and terpenoids in cold-pressed rapeseed and flaxseed oils during the induction period of oxidation, Food Chemistry, 278, 119–126, IF = 6,306; MNiSW2019 = 200 pkt. udział Doktorantki 70%.

Należy podkreślić bardzo wysokie wartości wskaźników bibliometrycznych wymienionych wyżej prac. Sumaryczny wskaźnik IF tych publikacji wynosi 29,494, a punktacja według MEiN 2021 – 740 pkt. Prace charakteryzują się wysokim poziomem merytorycznym, bardzo 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 doktorskiej mgr inż. Natalii Mikołajczak jest 126 stronicowe omówienie monotematycznego cyklu publikacji. Opracowanie obejmuje 7 rozdziałów w następującym układzie: streszczenie/abstrakt (w języku angielskim i polskim) (2 strony), informacje o finansowaniu (1 strona), wykaz publikacji (2 strony), wstęp literaturowy uzasadniający podjęcie badań (8 stron), hipotezy badawcze, cel pracy (1 strona), organizacja i metodyka badań (8 stron), rezultaty badań (24 strony), wnioski i podsumowanie badań (2 strony), literatura (8 stron), załączniki w tym oświadczenia współautorów i kopie publikacji (47 stron). W treści opracowania zawartych jest 9 tabel, 2 rysunki i 1 schemat. Do przygotowania opracowania Autorka wykorzystała 104 pozycje literaturowe. Wykorzystane piśmiennictwo jest w 97% anglojęzyczne, a prace pochodzące z ostatniej dekady stanowią 74%. Zamieszczone w opracowaniu wybrane wyniki badań poddane zostały analizie statystycznej i poprawnie zaprezentowane w czytelnych i bardzo starannie przygotowanych tabelach i na rysunkach. Opracowanie zostało przygotowane bardzo starannie, napisane jest poprawną polszczyzną i nie zawiera usterek redakcyjnych. Układ opracowania, podział na rozdziały jest prawidłowy i typowy. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne stawiane pracom dysertacyjnym na stopień doktora.

Ocena merytoryczna pracy

Wstęp uzasadniający podjęcie badań jest krótki, ale wystarczający. Ujęty został na 8 stronach w 4 podrozdziałach. Autorka scharakteryzowała m.in. znaczenie bioleń w diecie człowieka, możliwości ograniczania utleniania, mechanizmy przeciwutleniające związków fenolowych i omówiła rolę pochodnych kwasów fenolowych w hamowaniu utleniania olejów roślinnych.

Hipotezy badawcze i celowość przedsięwziętych badań Autorka przedstawiła w kolejnym rozdziale. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury postawiono cztery hipotezy badawcze: 1) Biooleje roślinne zawierają zróżnicowane zawartości związków fenolowych, od których istotnie zależy ich stabilność oksydacyjna 2) Pochodne kwasów fenolowych dodane do bioolejów roślinnych poprawiają ich stabilność oksydacyjną 3) Początkowy skład i początkowa jakość bioolejów roślinnych wpływają na skuteczność hamowania procesów utleniania przez pochodne kwasów fenolowych oraz 4) Pochodne kwasów fenolowych skutecznie ograniczają degradację składników bioaktywnych będącą następstwem procesów utleniania w bioolejach roślinnych. Sprecyzowano w tym rozdziale główny cel pracy, którym była ocena możliwości zastosowania pochodnych kwasów fenolowych (tj. 4-winylogwajakolu i 4-winylosyringolu) jako przeciwutleniaczy bioolejów roślinnych. Następnie przedstawiono 4 cele szczegółowe mające pomóc zweryfikować postawione wcześniej hipotezy. W mojej opinii hipotezy, cel główny i cele szczegółowe zostały prawidłowo określone i w pełni odpowiadają tematowi rozprawy.

Badania zaplanowane w pracy zostały podzielone na cztery zadania badawcze, którym odpowiadają kolejno cztery publikacje (P1-P4), a które wymieniono w następnym rozdziale opracowania. Przedstawiony czytelny schemat organizacji doświadczeń z podziałem na te cztery etapy wskazuje na konsekwencję Autorki w podejmowaniu kolejnych badań, które są powiązane z wynikami przeprowadzonych wcześniej eksperymentów.

Materiały do badań zostały krótko opisane tj. 30 olejów lnianych, 11 olejów otrzymanych z surowców różnych gatunków, najczęściej stosowane ze względu na łatwą dostępność i przystępną cenę – oleje: lniany i rzepakowy oraz dwie pochodne kwasów fenolowych - wzorce analityczne 4-winylogwajakol oraz 4-winylosyringol. Następnie dokładnie opisano metody badań, w tym podstawowe parametry jakości, zawartość wody, barwa, zawartość związków bioaktywnych, w tym związków fenolowych, stabilność oksydacyjną, w tym test Rancimat w temp. 110°C, test przechowalniczy w warunkach naturalnych w oświetlonym miejscu - symulacja przechowywania w warunkach sklepowych w temperaturze otoczenia oraz test przechowalniczy w warunkach wymuszonych w temp. 110°C przez okres odpowiedni dla czasu indukcji wyznaczonego w teście Rancimat. Opisano również metody statystyczne. Uważam, że przedstawiony w pracy materiał do badań i metody badań zostały dobrze i wyczerpująco scharakteryzowane.

Układ poszczególnych doświadczeń, sekwencja analiz z wykorzystaniem analiz instrumentalnych z wykorzystaniem GC-MS i RP-HPLC (dot. oznaczania zawartości i składu kwasów tłuszczowych, skwalenu, steroli, tokoferoli, karotenoidów, kwasów fenolowych), 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.

W kolejnym rozdziale pt. „Rezultaty badań przedstawione w monotematycznym cyklu publikacji” Autorka krótko opisała najważniejsze wyniki przeprowadzonych doświadczeń. Publikacja **P1** stanowi przegląd i zbiór danych literaturowych na temat zawartości i rodzaju związków fenolowych obecnych w olejach roślinnych, a także metod ich oznaczania oraz wpływu na stabilność oksydacyjną olejów roślinnych. W publikacji **P2** dokonano analizy zawartości wolnych związków fenolowych i kwasów fenolowych w 30 olejach lnianych oraz zbadano wpływ stanu wyjściowego olejów na stabilność oksydacyjną i powstawanie produktów utlenienia podczas przechowywania w naturalnych warunkach: 30 dni w temperaturze otoczenia z ekspozycją na światło (symulacja przechowywania w warunkach sklepowych). W publikacjach **P3** i **P4** zbadano zawartość wolnych związków fenolowych i kwasów fenolowych w handlowych bioolejach roślinnych (oleje konopny, makowy, krokoszowy, wiesiołkowy, z ostropestu, sojowy, słonecznikowy, kukurydziany, sezamowy, z czarnuszki, dyniowy, lniany, rzepakowy). W publikacji **P3**, w celu zwiększenia stabilności oksydacyjnej różnych bioolejów roślinnych, dodawano 4-winylogwajakol i 4-winylosyringol w różnych ilościach 20, 40, 60, 80 i 100 ppm. Badania wykazały, że dodatki pochodnych kwasów fenolowych poprawiły stabilność oksydacyjną w teście Rancimat olejów bogatych w kwas linolowy, ale ich skuteczność była różna. Publikacja **P3** dowodzi, że pochodne kwasów fenolowych mogą być stosowane jako dodatki przeciwutleniające do bioolejów roślinnych ze względu na ich działanie ochronne, przy czym dodatek 4-winylosyringolu może być bardziej skuteczny. Celem ostatniej publikacji **P4** było zbadanie wpływu 4-winylogwajakolu i 4-winylosyringolu dodanych w stężeniu 80 ppm na stopień degradacji związków fenolowych, nienasyconych kwasów tłuszczowych, steroli, tokoferoli, karotenoidów i skwalenu, obecnych w olejach tłoczonych na zimno, lnianym i rzepakowym w teście przechowalniczym. Badania dowiodły, że związki bioaktywne ulegają znacznej degradacji podczas utleniania, w analizowanych olejach po przechowywaniu oznaczono jedynie 54-56% steroli, 35-46% karotenoidów, 19-22% skwalenu i 78-84% kwasu α -linolenowego. Dodatek pochodnych kwasów fenolowych pozwolił zatrzymać większość natywnych składników olejów tłoczonych na zimno, w tym głównie steroli oraz karotenoidów i skwalenu.

Bardzo szeroki zakres badań i przeprowadzonych licznych analiz pozwolił Autorce na uzyskanie szerokiego spektrum wyników, co stanowi solidną podstawę do szczegółowej charakterystyki związków bioaktywnych w olejach tłoczonych na zimno i ich degradacji w czasie przechowywania. Należy podkreślić, że jest niewiele doniesień dotyczących możliwości zastosowania pochodnych kwasów fenolowych jako przeciwutleniaczy w bioolejach, zatem oceniany cykl publikacji stanowi ważny wkład do literatury naukowej w tym zakresie.

W rozdziale "Wnioski i podsumowanie badań" Autorka przedstawiła siedem bardzo zwięzłych wniosków, wynikających bezpośrednio z przeprowadzonych badań. Zaprezentowane wnioski odnoszą się do celu pracy i zadań badawczych oraz wskazują na pełną realizację zaplanowanych badań.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej potwierdziły postawione na początku hipotezy badawcze, mianowicie natywne polifenole obecne w oleju oraz dodane winylowe pochodne kwasu ferulowego i sinapowego zwiększają stabilność oksydacyjną bioolejów roślinnych. Na koniec Autorka podkreśliła, że mimo potwierdzenia głównych hipotez badawczych istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań naukowych, gdyż skuteczność działania natywnych i dodanych związków fenolowych zależy nie tylko od ich rodzaju i stężenia, ale także od charakterystyki jakościowej stabilizowanego oleju. Aktualna literatura na ten temat jest nadal nieliczna i brakuje badań nad interakcjami pochodnych kwasów fenolowych z innymi składnikami olejów roślinnych w procesach utleniania i hydrolizy.

Podsumowując stwierdzam, że zaplanowane przez Doktorantkę bardzo obszerne badania zostały konsekwentnie zrealizowane, cel pracy został osiągnięty, a zadania badawcze wykonane. Otrzymane liczne wyniki analiz instrumentalnych zostały poddane odpowiedniej analizie statystycznej, zostały z powodzeniem opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Badania dostarczają wartościowych informacji teoretycznych i gotowych rozwiązań praktycznych z zakresu analizy jakości i składu wybranych olejów tłoczonych na zimno, wnoszą nowe informacje dotyczące związków fenolowych jako przeciwutleniaczy olejów roślinnych. Należy jasno podkreślić, że przedstawione w recenzji krytyczne uwagi i spostrzeżenia miały na celu doskonalenie warsztatu naukowo-badawczego Autorki.

Z obowiązku recenzenta wskazuję poniżej zagadnienia wymagające dyskusji:

- 1) dlaczego typowe oleje tłoczone na zimno - lniany i rzepakowy (szeroko dostępne na rynku) nazwano bioolejami/olejami farmaceutycznymi;
- 2) co to są metody zachowawcze otrzymywania olejów? czy rafinacja fizyczna, biorąc pod uwagę jej etapy i parametry technologiczne jest oczyszczaniem zachowawczym?
- 3) czy olej słonecznikowy użyty do badań był typowym olejem słonecznikowym w kontekście informacji podanych na stronie 38? „Wyniki badań wykazały, że materiał do badań był generalnie dobrej jakości, a skład kwasów tłuszczowych i związków bioaktywnych był typowy dla danego oleju.” „Najbogatsze w kwas linolowy były oleje wiesiołkowy, krokoszowy i makowy (>70% sumy kwasów tłuszczowych), natomiast oleje dyniowy, słonecznikowy i sezamowy charakteryzowały się najniższą procentową zawartością tego kwasu (<48%)”;
- 4) czy w pełni zasadny jest wniosek 2? „Zawartość związków fenolowych w bioolejach roślinnych otrzymanych z tego samego rodzaju surowca jest zależna m.in. od ilości wody przenikającej do oleju podczas procesu wydobycia i rafinacji.” w kontekście informacji ze strony 34: „Wskazywać na to mogą obliczone współczynniki korelacji liniowej Pearsona, r w zakresie 0,30-0,39 dla zależności zawartości wody z zawartością związków fenolowych oraz głównych kwasów fenolowych, potwierdzające istnienie przeciętnej korelacji.”

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Mikołajczak stanowi interesujące i innowacyjne opracowanie naukowe o charakterze poznawczym i aplikacyjnym. Dotyczy ono możliwości zastosowania pochodnych kwasów fenolowych tj. 4-winylogwajakolu i 4-winylosyringolu jako przeciwutleniaczy bioolejów roślinnych. Praca przyczynia się do poszerzenia wiedzy z zakresu nauk o żywności i żywieniu, jest oryginalnym ujęciem podjętego problemu. Praca została zrealizowana przy pomocy bardzo dobrze dobranych, nowoczesnych, instrumentalnych technik badawczych, dowodzi, że Autorka opanowała warsztat badawczy, potrafi stawiać i rozwiązywać problemy badawcze, co pozwala na samodzielne prowadzenie badań naukowych, a dodatkowo wskazuje na szeroką wiedzę teoretyczną w reprezentowanym temacie.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca Pani Natalii Mikołajczak pt. "Zastosowanie pochodnych kwasów fenolowych do stabilizacji bioolejów roślinnych" 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.), art. 179 Ustawy z 3 lipca 2018 r – Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1669 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Natalii Mikołajczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Malgosza Krowiec