

Dr hab. Aleksander Siger
Katedra Biochemii i Analizy Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Grzegorza Dąbrowskiego
pt.: „Surowcowe i technologiczne uwarunkowania ekstraktywności fazy tłuszczowej oraz
składu i trwałości oleju pozyskanego z nasion szafalii hiszpańskiej (*Salvia hispanica* L.)”
wykonanej w Katedrze Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych Wydziału Nauki o Żywności
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem dr hab. inż. Iwony Konopki, prof.
UWM oraz dr hab. inż. Sylwestra Czaplickiego (promotor pomocniczy)

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Grzegorza Dąbrowskiego obejmuje
88 stronicowe opracowanie, w którym omówiono wyniki badań opublikowanych w czterech
czasopismach:

1. Dąbrowski G., Skrajda M. Nasiona szafalii hiszpańskiej (*Salvia hispanica* L.) jako źródło składników wykazujących dobroczynny wpływ na ludzki organizm.
Journal of Education, Health and Sport (2015, 5, 9, 337-350), (7 pkt. MNiSW);
2. Dąbrowski G., Konopka I., Czaplicki S., Tańska M. Composition and oxidative stability of oil from *Salvia hispanica* L. seeds in relation to extraction method.
European Journal of Lipid Science and Technology (2017, 119, 5, 1600209), (IF = 1,812; 25 pkt. MNiSW);
3. Dąbrowski G., Konopka I., Czaplicki S. Supercritical CO₂ extraction in chia oils production: impact of process duration and co-solvent addition.
Food Science and Biotechnology (2018, 27, 3, 667-686), (IF = 0,653; 20 pkt. MNiSW);
4. Dąbrowski G., Konopka I., Czaplicki S. Variation in oil quality and content of low molecular lipophilic compounds in chia seed oils.
International Journal of Food Properties, (2018, 21, 1, 2016-2029), (IF = 0,915; 25 pkt. MNiSW).

Publikacje te ukazały się w latach 2015-2018. Trzy z przedstawionych prac ukazały się w czasopismach anglojęzycznych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, przy czym ich sumaryczny Impact Factor wynosi 3,380, suma punktów MNiSW – 77 (lista A i B), a łączna liczba cytowań - 7. We wszystkich publikacjach Doktorant jest autorem pierwszym i korespondencyjnym, a Jego wkład szacuje się na 50 do 85%. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów obejmuje on autorstwo koncepcji badań, udział w wykonaniu doświadczeń oraz większości oznaczeń, analizę i opracowanie wyników, wyciągnięcie

wniosków, napisanie i redakcję manuskryptów. Cykl omawianych publikacji jest ujęty pod ogólnym tytułem: „Surowcowe i technologiczne uwarunkowania ekstraktywności fazy tłuszczowej oraz składu i trwałości oleju pozyskanego z nasion szałwii hiszpańskiej (*Salvia hispanica* L.)”.

Dysertacja mgr inż. Grzegorza Dąbrowskiego stanowi oryginalne opracowanie naukowe dotyczące problemu pozyskiwania oleju z niekonwencjonalnego surowca, jakim są na europejskim rynku, nasiona szałwii hiszpańskiej (*Savia hispanica* L.). Określono wpływ zastosowania różnych metod pozyskania oleju na ekstraktywność ważnych żywieniowo składników oraz stabilność przechowalniczą olejów z nasion szałwii hiszpańskiej.

Praca ma typowy, jak dla rozpraw doktorskich realizowanych w oparciu o spójny tematycznie zbiór publikacji, układ struktury podziału treści. Obejmuje on streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp uzasadniający podjęcie badań, cel i hipotezę badawczą, zastosowane metody analityczne, omówienie wyników prezentowanych w publikacjach, wnioski i podsumowanie oraz spis piśmiennictwa. Integralną część pracy stanowią załączone na końcu kserokopie publikacji oraz oświadczenia współautorów.

Pierwszy rozdział opracowania to „Wstęp” - rozdział ten liczący 7 stron stanowi jednocześnie przegląd literatury, w którym Doktorant uzasadnił celowość podjętych badań. W pierwszym podrozdziale „Znaczenie gospodarcze i społeczne uprawy szałwii hiszpańskiej”, oprócz krótkiego opisu pochodzenia tej rośliny Doktorant podkreśla fakt, iż nasiona chia na terenie Unii Europejskiej traktowane są jako tzw. „nowa żywność” i z tego względu ich stosowanie jest ciągle ograniczone, a dzienne spożycie powinno wynosić nie więcej niż 15 g (dla nasiona) i 2 g w przypadku oleju (zgodnie z rozporządzeniem wykonawczym komisji UE (2017/2470) z dnia 20 grudnia 2017 r.). W dalszej części opracowania Doktorant skupia się na omówieniu frakcji lipidowej nasion – w szczególności procentowym udziale kwasów tłuszczowych. Podkreśla wysoki udział kwasu α -linolenowego (68%) zaliczanego do kwasów tłuszczowych z grupy n-3 i opisuje jego żywieniowe znaczenie w diecie człowieka. W tabelarycznym zestawieniu Doktorant przedstawił dane literaturowe z lat 1995-2015 odnośnie zawartości związków biologicznie aktywnych w nasionach oraz w oleju z nasion szałwii hiszpańskiej. Zestawienie to pokazało, że dane te są fragmentaryczne i często sprzeczne, co też potwierdza celowość i słuszność podjęcia badań. W podrozdziale „1.2 Techniki stosowane do wydobycia oleju z nasion szałwii hiszpańskiej” Doktorant opisał trzy metody otrzymywania

oleju: poprzez tłoczenie, ekstrakcję z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych oraz ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika w stanie nadkrytycznym. Jednocześnie wskazał, że metoda wydobycia oleju z nasion istotnie wpływa na jego charakterystykę fizyko-chemiczną, co też w dalszej części pracy („Cel pracy”) pozwoliło na postawienie takowej hipotezy badawczej. Aby zweryfikować przyjętą hipotezę zaprojektowano zakres badań, który obejmował zastosowanie różnych metod pozyskania oleju: tłoczenie na zimno i na gorąco przy zastosowaniu prasy ślimakowej, ekstrakcję metodą Soxhleta (rozpuszczalnik *n*-heksan i aceton) oraz ekstrakcję CO₂ w stanie nadkrytycznym bez i z modyfikatorem (do 10% acetonu). Dodatkowym celem badań była ocena zawartości i składu frakcji lipidowej 15 partii nasion chia dostępnych na rynku w Polsce pochodzących z pięciu różnych krajów. W kolejnym rozdziale „Metodyka badań” Doktorant krótko opisuje metody wydobycia oleju oraz zastosowane metody analityczne, wskazując, iż szczegółowe informacje nt. zastosowanych technik wydobycia oleju oraz procedur analitycznych zamieszczono w monotematycznym cyklu publikacji. W rozdziale 5 „Rezultaty badań” na 10 stronach Doktorant poprawnie opisał i przedyskutował najważniejsze wyniki zawarte w dołączonych publikacjach. Wyniki uzyskanych badań Doktorant podsumował 7 wnioskami oraz podsumowaniem. W swojej pracy doktorskiej Pan mgr inż. Grzegorz Dąbrowski rozwiązał postawione zadanie badawcze i osiągnął założony cel pracy, planując oraz realizując doświadczenia w sposób zgodny z wymaganiami współczesnej nauki. W opinii recenzenta, do najważniejszych naukowych i praktycznych osiągnięć ocenianej rozprawy należą:

- Wykazanie, że metoda wydobycia oleju z nasion szafalii hiszpańskiej istotnie wpływa na zawartość związków biologicznie aktywnych (szczególnie skwaleniu i związków fenolowych) w pozyskanym oleju.
- Wykazanie, że użycie acetonu do ekstrakcji klasycznej oraz jako modyfikatora do ekstrakcji nadkrytycznej pozwala na zwiększenie zawartości we frakcji tłuszczowej karotenoidów oraz związków fenolowych.
- Wykazanie, że udział acetonu jako modyfikatora w ekstrakcji nadkrytycznej ma największy wpływ na skład olejów przypadku ekstrakcji krótkotrwałej.
- Wykazanie, że skrócenie czasu ekstrakcji techniką SFE oraz barak acetonu jako modyfikatora skutkuje zwiększeniem stężenia w oleju fitozwiązków najmniej polarnych (skwalen, tokoferole i sterole).

- Wykazanie, że stabilność oksydacyjna olejów z nasion szałwii hiszpańskiej jest najsilniej skorelowana z zawartością związków fenolowych.

Treść pracy jest zgodna z jej tytułem, zaś problematyka poruszana w ramach poszczególnych rozdziałów odzwierciedla informacje zawarte w publikacjach wykorzystanych do jej opracowania. Doktorant zachował poprawne proporcje wielkości rozdziałów. Sposób omówienia wyników cechuje konsekwencja i logika naukowa, co umożliwia właściwe rozumienie prezentowanych treści. Dobór procedur analitycznych i przygotowawczych nie budzi zastrzeżeń oraz potwierdza bardzo dobre opanowanie warsztatu przez Doktoranta, co umożliwiło realizację założonych zadań badawczych. Sposób opracowania, interpretacja wyników i ich dyskusja zostały przeprowadzone prawidłowo. Doktorant posiada umiejętności samodzielnego planowania eksperymentów, ich wykonania oraz analizy uzyskanych danych. Zaprezentowane wyniki badań mają charakter poznawczy jak i aplikacyjny. Wnoszą nowe dane nt. naturalnej zmienności tłuszczu obecnego w nasionach szałwii hiszpańskiej oraz wskazują jakie techniki i warunki ekstrakcji pozwolą na wyprodukowanie specyficznych typów olejów np. bogatych w natywne związki biologicznie aktywne.

Przedstawiona do oceny rozprawa przygotowana jest poprawnie, jednakże Autorowi nie udało się uniknąć pewnych uchybień i niejasności. Wywiązując się z obowiązku recenzenta, poniżej zamieszczam listę uwag i niejasności, prosząc o ustosunkowanie się lub ich wyjaśnienie:

- w opracowaniu brakuje indeksu skrótów.
- Str. 7-8 – Doktorant często stosuje skróty myślowe np.: „kwasy n-3” i „kwasy n-6”. Czy fragment zdania „aktualna dieta zachodnia jest niekorzystna dla zdrowia, ponieważ proporcja n-6 do n-3 wynosi w niej ok. 16:1, co oznacza znaczny nadmiar n-6.” nie brzmiałby lepiej „... jest niekorzystna dla zdrowia, ponieważ proporcja kwasów tłuszczowych rodziny n-6 do n-3 wynosi w niej ok. 16:1, co oznacza znaczny nadmiar kwasów tłuszczowych rodziny n-6”.
- Str. 8 – „aktualna dieta zachodnia” – zmieniłbym na „obecna dieta zachodnia lub obecny zachodni sposób odżywiania”,
- Str. 9 – tabela powinna być podzielona na kilka mniejszych tabel w których przedstawiono by dane literaturowe wszystkich związków będących w zainteresowaniu Doktoranta. W tabeli tej znajduje 11 pozycji literaturowych odnoszących się głównie do składu kwasów

tłuszczowych. Natomiast tylko 3-4 pozycje dotyczą zawartości tokoferoli oraz steroli. Jednocześnie w tekście poniżej omawiane są także karotenoidy i związki fenolowe, które warto byłoby umieścić w tej tabeli.

- Str. 10 – Doktorant powołuje się na przepisy UE (WE nr 258/97; C(2014) 9209) w których czytamy, że dopuszczony do obrotu na terenie UE olej z szalwii hiszpańskiej jest wytwarzany metodą tłoczenia. Ponadto na stronie 11 podaje informację „Chociaż na terenie UE może być w obrocie jedynie olej tłoczony...”. Moim zdaniem należałoby to uzupełnić o informację że olej z nasion chia „Może być również wytwarzany na drodze ekstrakcji z zastosowaniem CO₂ w stanie nadkrytycznym.” (zgodnie z rozporządzeniem wykonawczym komisji UE (2017/2470) z dnia 20 grudnia 2017 r.).
- Str. 15 – w rozdziale „Metodyka badań” brakuje dokładnego opisu materiału użytego do badań np. rok zakupu, pochodzenia, wilgotności nasion. Dotyczy to głównie publikacji P2 i P3, gdzie uzyskane wyniki, mimo identycznych parametrów ekstrakcji, znacząco się różniły oraz stały się podstawą do wysunięcia dodatkowego wniosku o surowcowym wpływie na jakość i skład oleju. Domyślam się że były to inne partie surowca?
- Str. 15 – brak informacji dotyczącej jak przechowywano otrzymane próbki oleju do czasu wykonania poszczególnych analiz.
- Str. 15 – błąd językowy „Ekstrakcja z użyciem aparatu Soxhleta wykonano...”
- Str. 15 – dlaczego proces ekstrakcji metodą Soxhleta prowadzono aż 18 godzin? Czy ekstrakcję prowadzono w atmosferze gazu obojętnego? Wg zacytowanej normy ISO 734-03:2016 przewidziany czas ekstrakcji jest krótszy.
- Str. 11 i 16 – kolejne skróty myślowe „czas indukcji oznaczono” – zamieniłbym na oznaczenie stabilności oksydacyjnej”
- Str. 22 i 25 – w zdaniu dotyczącym zawartości tokoferoli w otrzymanych olejach Autor podaje „że największy udział w tej frakcji stanowiła mieszanina β + γ -tokoferolu (ok. 75-80%)”. Taka informacja pojawia się także w pracy P3. Natomiast w pracy P2 i P4 podana jest informacja że dominuje homolog γ -tokoferolu, który stanowił ok. 92% sumy tokoferoli. Proszę o wytłumaczenie czy zastosowana metoda oznaczania tokoferoli pozwala oznaczyć wszystkie 4 homologii tych związków (α -, β -, γ -, δ -T). Czy w przypadku zastosowanego układu chromatograficznego, gdzie fazą ruchomą była mieszanina *n*-heksanu z 0,7% dodatkiem izopropanolu, możliwe było rozdzielenie izomerów β i γ -tokoferolu?

- Str. 51 – załączona publikacja monotematycznego cyklu nie jest ostateczną wersją pracy z pełnymi danymi bibliograficznymi.

Proszę Doktoranta aby odniósł się do następujących kwestii:

- Proszę o dokładne omówienie jak pozyskano olej z nasion szałwii hiszpańskiej poprzez tłoczenie na gorąco. Autor podaje informację że tłoczono olej z nasion kondycjonowanych w temperaturze 110°C. Czy różnica pomiędzy tłoczeniem na zimno i na gorąco polegała tylko na różnej temperaturze nasion? Jak była temperatura matrycy prasy w przypadku tłoczenia na zimno i na gorąco? Czy temperatura matrycy prasy lub wypływającego oleju była monitorowana?
- Nasiona szałwii hiszpańskiej charakteryzują się wysoką zawartością błonnika rozpuszczalnego (absorbującego 27 razy więcej wody od swojej masy) tworzącego wysoce hydrofilowy śluz. Są to polisacharydy o masie cząsteczkowej od 0,8 do 2×10^6 Da, i są zlokalizowane w egzokarpie, w pierwszych trzech warstwach komórkowych. Po kontakcie z wodą, uwodnione włókna śluzu są częściowo wytłaczane na zewnątrz nasion i tworzą przezroczystą tzw. „kapsułę”, która pozostaje silnie związana z zewnętrznymi warstwami nasion. I tutaj pytanie jak przed procesem tłoczenia oleju nawilżano nasiona szałwii hiszpańskiej?
- Jak przeprowadzono proces kondycjonowania nasion? Jaka była ich wilgotność po zakończonym procesie kondycjonowania? Ogrzewanie nasion przez 1 godz. w temperaturze 110°C zapewne spowodowało spadek ich wilgotności, co może istotnie wpływać na pracę prasy. Czy nie było problemów z ciągłością jej pracy?
- Doktorant stwierdził, że metoda pozyskania oleju (tłoczenie vs. ekstrakcja) w niewielkim stopniu wpłynęła na skład kwasów tłuszczowych. Czy Doktorant posiada informacje na temat ilościowych zmian kwasów tłuszczowych? Jest to szczególnie ważne w przypadku nasion szałwii hiszpańskiej poddanych ogrzewaniu w temperaturze 110°C? Dane literaturowe dotyczące innych surowców potwierdzają nieznaczny wpływ obróbki termicznej nasion na zmianę profilu kwasów tłuszczowych (%). Jednakże, analiza ilościowa wskazuje istotny wpływ ogrzewania nasion oleistych na zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych (np. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2017, 119, 1600501).
- Odczuwam pewien niedosyt dotyczący oznaczania zawartości związków fenolowych w analizowanych olejach. Doktorant podaje, że zawartość związków fenolowych oznaczał

metodą spektrofotometryczną z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. Metodą tą można oznaczyć nie tylko związki fenolowe ale wszystkie substancje o właściwościach redukujących (metoda nie jest specyficzna). Mając do dyspozycji dobrze wyposażone w chromatografy laboratorium Doktorant mógł zidentyfikować i oznaczyć zawartość poszczególnych związków fenolowych. Szczególnie że dane literaturowe na ten temat są bardzo ograniczone. A i sam Autor podkreśla wagę tych związków w zachowaniu stabilności oksydacyjnej oleju z nasion szałwii hiszpańskiej. Proszę o przedstawienie krótkiej informacji, na podstawie znanych danych literaturowych, jakie związki fenolowe występują w nasionach szałwii hiszpańskiej? Czy są dostępne informacje jaka ich ilość przechodzi do oleju w trakcie jego pozyskiwania?

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Grzegorza Dąbrowskiego nie budzi zastrzeżeń merytorycznych. Wymienione powyżej nieliczne uchybienia nie pomniejszają jej wartości poznawczej i aplikacyjnej. Wyniki pracy wnoszą oryginalny wkład do rozwoju wiedzy z zakresu technologii żywości i żywienia. Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca, spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. 2003 r. numer 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) o tytułach i stopniach naukowych i z całym przekonaniem stawiam wniosek Radzie Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pana mgr inż. Grzegorza Dąbrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Aleksander Siger