

Dr hab. inż. Tomasz Piechowiak, prof. UR
Zakład Chemii i Toksykologii Żywności
Instytut Technologii Żywności i Żywienia
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski
Ul. Ćwiklińskiej 1A, 35-601 Rzeszów

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Alicji Kizildag

pt. „Białka roślinne w mikrokapsułkowaniu olejków eterycznych z wykorzystaniem koacerwacji złożonej”

Informacje dotyczące rozprawy doktorskiej i sylwetki naukowej Doktorantki

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Alicji Kizildag powstała pod opieką prof. dr hab. Marcina Kurka w Katedrze Techniki i Projektowania Żywności, w Instytucie Nauk o Żywieniu Człowieka Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Rozprawę doktorską stanowi cykl 5 powiązanych ze sobą tematycznie, oryginalnych artykułów naukowych, złożony z pracy przeglądowej (Napiórkowska i Kurek, 2022, *Molecules*, <https://doi.org/10.3390/molecules27165142>) oraz 4 prac eksperymentalnych (Napiórkowska i wsp., 2023, *Foods*, <https://doi.org/10.3390/foods12234345>; Napiórkowska i wsp., 2024, *Journal of Food Science*, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17220>; Napiórkowska i wsp., 2024, *Food and Bioproduct Processing*, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.04.001>; Napiórkowska i wsp., 2024, *Molecules*, <https://doi.org/10.3390/molecules29092019>). Publikacje te, ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych, których łączny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF) - zgodny z rokiem wydania - wynosi 22,9. Doktorantka jest wiodącym autorem we wszystkich publikacjach, a jej udział obejmował m.in. analizę i krytyczną ocenę dostępnej literatury, opracowanie metodologii, wykonanie większości prac eksperymentalnych oraz napisanie manuskryptu i korektę tekstu po recenzji.

Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały omówione w 62-stronicowym opracowaniu, o typowej i poprawnej strukturze. Zawiera ono następujące rozdziały: „Streszczenie”, „Abstract”, „Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń wraz z jednostkami”, „Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską”, „Wstęp”, „Hipotezy badawcze, cel pracy oraz zakres badań”, „Materiał i metodyka badań”, „Omówienie głównych wyników”, „Wnioski” oraz „Bibliografia”. Kolejne części rozprawy tworzą: „Pozostały dorobek naukowy” oraz „Publikacje stanowiące rozprawę doktorską wraz z oświadczeniami współautorów”.

Styl pisania opracowania jest jasny i łatwy do zrozumienia. Można jednak odnaleźć nieliczne błędy stylistyczne i skróty myślowe. Na przykład (i) w zdaniu ze str. 18 tj. „Do utraty tej może dochodzić na trzech etapach procesu...” brakuje słów kluczowych (tej

grupy substancji/związków itp.); (ii) w zdaniu ze str. 22 tj. „*Produkcja białek roślinnych wymaga mniejszej ilości zasobów naturalnych, takich jak woda i ziemia w porównaniu...*”, słowo „*ziemia*” jest dobrane niefortunnie, zaś słowo „*gleba*” jest bardziej precyzyjne i jest terminem naukowym; (iii) w zdaniu ze str. 46, tj. „*Wydajność mikrokapsułkowania (SY) (...) była istotnie ($p \leq 0,05$) zależna od pH w sposób kwadratowy...*”, wyrażenie „*w sposób kwadratowy*” jest skrótem myślowym i należałoby je zastąpić pełnym opisem zaobserwowanej zależności między zmiennymi. Szata graficzna przedłożonego opracowania jest generalnie poprawna, lecz rozdzielczość niektórych rycin powinna być wyższa (np. Ryc. 1, Ryc. 6).

Mimo wskazanych powyżej „niedociągnięć”, uważam, że wartość merytoryczna rozprawy doktorskiej, jest na tyle wysoka, że błędy edytorskie nie stanowią istotnego wpływu na ostateczną jakość pracy i odbiór dokonanych przez Doktorantkę odkryć.

Ocena merytoryczna rozprawy

W świetle dotychczasowej wiedzy, olejki eteryczne, jako wtórne metabolity roślin, wykazują szerokie spektrum oddziaływań biologicznych, istotnych zarówno w obszarze farmakologicznym jak i technologicznym. W aspekcie technologicznym, olejki eteryczne mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako naturalne „biokonserwanty żywności”, z uwagi na ich silną zdolność do redukcji namnażania drobnoustrojów powodujących psucie żywności, hamowanie oksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych w produktach bogato-tłuszczowych oraz zwiększanie właściwości antyoksydacyjnych żywności. Jednak ograniczenia aplikacji olejków eterycznych w postaci surowej do utrwalania żywności, związane m.in. ze zmianą cech sensorycznych produktów, nierozpuszczalnością w wodzie i migracji fazy olejowej lub łatwością do utleniania się, powodują, że istnieje potrzeba poszukiwania sposobu, który zredukuje lub wyeliminuje wskazane efekty niepożądane. Doktorantka, wobec powyższego, podjęła się wyzwania, które polegało na opracowaniu rozwiązania dostarczania do żywności olejków eterycznych (mikrokapsułkowania), bazującego na koacerwacji z użyciem białek i polisacharydów roślinnych, w wyniku którego sproszkowany (liofilizat) koacerwat może być wykorzystany jako środek do utrwalania żywności. W mojej ocenie uważam, że kierunek badań podjęty przez Doktorantkę jest trafny i doskonale wpisuje się w aktualne trendy badawcze dyscypliny technologia żywności i żywienia, zmierzające do wdrażania do przemysłu alternatywnych technologii przedłużania trwałości żywności.

Autorka pracy wyznaczyła 3 zasadnicze cele badawcze, które w wyniku wykonania określonych eksperymentów zostały przez Doktorantkę w pełni osiągnięte. Dotyczyły one (i) wykazania możliwości zastosowania koacerwacji złożonej z użyciem białek roślinnych jako metody kapsułkowania olejków eterycznych; (ii) analizy właściwości fizykochemicznych proszków otrzymanych przez liofilizację płynnych koacerwatów; (iii) porównania koacerwatów zawierających białka roślinne, z tradycyjnym modelem koacerwacji złożonej, który wykorzystuje żelatynę i gumę arabską w celu oceny ich efektywności i właściwości użytkowych. Wyniki uzyskanych badań, wraz z ich dyskusją, które stanowią odpowiedź na postawione pytania badawcze, zostały przedstawione w pracach I-IV:

I. Napiórkowska A, Szpicer A, Wojtasik-Kalinowska I, Perez MDT, González HD, Kurek MA. Microencapsulation of Juniper and Black Pepper Essential Oil Using the Coacervation Method and Its Properties after Freeze-Drying. *Foods*. 2023; 12(23):4345.

II. Napiórkowska, A., Szpicer, A., Górską-Horczyżczak, E., & Kurek, M.. Understanding emulsifier influence on complex coacervation: Essential oils encapsulation perspective. *Journal of Food Science*. 2024, 89(8).

III. Napiórkowska A, Aktaş A, Szpicer A, Górską-Horczyżczak E, Kurek MA. Optimization of oat protein and gum Arabic microcapsules containing juniper essential oil using Response Surface Methodology, *Food and Bioproducts Processing*, 2024, 145,203-216.

IV. Napiórkowska A, Szpicer A, Górską-Horczyżczak E, Kurek MA. Microencapsulation of Essential Oils Using Faba Bean Protein and Chia Seed Polysaccharides via Complex Coacervation Method. *Molecules*. 2024; 29(9):2019.

Wprowadzenie do części eksperymentalnej stanowi obszerna i wyczerpująca temat publikacja „Napiórkowska A, Kurek M. Coacervation as a Novel Method of Microencapsulation of Essential Oils—A Review. *Molecules*. 2022; 27(16):5142”. W artykule tym, Autorka rozprawy wskazała potrzebę poszukiwania alternatywnych środków utrwalania żywności, która jest podyktowana trendem „czystej etykiety”, a także dokonała charakterystyki i właściwości biologicznych olejków eterycznych oraz omówiła aktualne rozwiązania w mikrokapsułkowaniu olejków eterycznych, w tym koacerwacji złożonej. Praca została napisana w sposób przejrzysty i przystępny dla szerokiego grona odbiorców.

Pierwsza publikacja eksperymentalna (publikacja I) przedstawia badania nad optymalizacją klasycznej koacerwacji złożonej między żelatyną a gumą arabską do mikrokapsułkowania olejków eterycznych (z pieprzu czarnego i jagód jałowca) oraz analizę cech fizykochemicznych uzyskanego koacerwatu. W ramach badań, Doktorantka przygotowała łącznie po 6 wariantów sproszkowanych (liofilizowanych) koacerwatów, oddzielnie dla mikrokapsułek z olejkiem pieprzowym oraz jałowcowym, różniących się ponadto, nośnikiem (olej sojowy, olej z pestek winogron), w którym rozpuszczony był olejek oraz udziałem masowym żelatyny do gumy arabskiej (1:1, 1:2, 2:1). Następnie, uzyskane proszki poddała podstawowym i bardziej zaawansowanym analizom fizykochemicznym i chemicznym. O ile większość metodyk została przejrzysto przedstawiona w opracowaniu i publikacji, zwracam się z prośbą do Doktorantki, o wyjaśnienie następujących kwestii:

- U1. W opracowaniu (str. 27 rozprawy) wydajność koacerwacji (CY) była określana przez obliczenie stosunku masy płynnego koacerwatu (CM) do masy całego układu (SM) ($\times 100\%$), z kolei w publikacji, CM oznacza masę koacerwatu po procesie, zaś SM, masę całkowitą po liofilizacji. Proszę o wyjaśnienie, który sposób obliczeń jest poprawny oraz o informację, czy i jaką technikę fizyczną zastosowano do oddzielenia koacerwatu z układu, (w celu określenia CM), ponieważ układ płynny po koacerwacji, będzie składał się również z cząstek, które nie uległy koacerwacji.

- U2. W opracowaniu i publikacji straty podczas liofilizacji (SY) określane są przez obliczenie stosunku masy proszku uzyskanego po liofilizacji (PM) do masy uwodnionego

koacerwatu (CM) (x100 %). Obliczony parametr wskazuje bardziej na ubytek wody podczas liofilizacji, niż na straty składnika aktywnego. Wiadome jest, że różny skład koacerwatów będzie determinować różną strukturę proszków, która została potwierdzona przez mikroskopię SEM, a to w efekcie będzie kształtowało różną szybkość dyfuzji wody podczas liofilizacji. Uważam zatem, że SY określony w takiej postaci jest zbędny, a bardziej precyzyjne jest określenie ubytku frakcji lotnej podczas liofilizacji (np. chromatograficznie).

Najważniejszym parametrem pozwalającym określić „optymalny” skład koacerwatu jest w mojej ocenie, efektywność kapsułkowania. Wyniki badań pokazały, że na wydajność enkapsulacji wpływał wyraźnie rodzaj oleju roślinnego (olej z pestek winogron lub olej sojowy) wykorzystanego jako rozpuszczalnik oleju oraz interakcja między olejkiem eterycznym a składem układu ściennego (tabela 1). Doktorantka wykazała największą wydajność enkapsulacji dla próbki SJ1 (64.09 %). Analizując Tabelę 1 oraz tekst zauważyłem pewną nieścisłość, która powinna zostać wyjaśniona:

- U3. W tekście opracowania oraz publikacji, Autorka rozprawy pisze, że „*Analiza statystyczna wykazała, że wyniki zależały od interakcji między stosunkiem mieszania polimerów a olejem (Tab. 1)*”, a w rubryce dotyczącej interakcji między olejem a MR widnieje „NS”, wskazując jednak na brak istotnej interakcji. Z drugiej strony, zgodnie z danymi przedstawionymi w tabelach, istotną interakcję zanotowano między olejkiem eterycznym a składem materiału ściennego, przy $p \leq 0,001$, co nie zostało opisane w tekście.

Kolejną część wyników stanowi szczegółowa charakterystyka fizykochemiczna oraz chemiczna uzyskanych proszków. Doktorantka, wykazała, że proszki uzyskane w wyniku liofilizacji koacerwatów, otrzymanych przez zmieszanie G/GA w stosunku 1:1 charakteryzowały się najmniejszymi rozmiarami cząstek, lecz nie generowało to wzrostu gęstości nasypowej oraz wzrostu ich higroskopijności. Wyniki badań zostały również uzupełnione o inne wartościowe wskaźniki tj. barwę w skali CIELab, strukturę proszków za określoną za pomocą Skaningowej Mikroskopii Elektronowej, widma w zakresie IR (technika FT-IR), właściwości termiczne proszków (metoda kalorymetrii różnicowej), profil związków lotnych metodą ultraszybkiej chromatografii gazowej (nos elektroniczny). Doktorantka stwierdziła obecność wszystkich substancji lotnych kształtujących olejki eteryczne w wytworzonych mikrokapsułkach, co przypuszczalnie dowodzi o skuteczności enkapsulacji. Moją ciekawość budzi smak i zapach mikrokapsułek z olejkami eterycznymi. Autorka we wstępie formułuje przypuszczenie, że enkapsulacja może maskować zapach olejku, redukując potencjalnie wpływ dodatku mikrokapsułek na cechy sensoryczne produktu. Niestety żadna z prac (I-IV) nie zawiera takiej odpowiedzi. Wobec tego uważam, że rozprawa mogłaby zyskać na swojej wartości, gdyby zawierała chociażby wyniki analizy sensorycznej uzyskanych proszków lub modelowego produktu z dodatkiem mikrokapsułek.

Celem badań podjętych w publikacji II było wykazanie, że żelatyna, jako tradycyjnie wykorzystywany biopolimer w koacerwacji olejku eterycznego może być zastąpiona białkiem z grochu, a także sprawdzenie, czy wprowadzenie go do układu wpłynie na wydajność procesu koacerwacji i właściwości uzyskanych mikrokapsułek. W ramach

badania, Doktorantka zastosowała bardzo podobny układ eksperymentalny jak w publikacji I, z taką różnicą, że żelatynę zastąpiono białkiem grochowym, a także włączono dodatkową grupę badaną (mikrokapsulek), do której podczas wytwarzania, zaaplikowano emulgator w ilości 0,5 % składu. Po wykonaniu szeregu analiz fizykochemicznych i chemicznych, podobnych jak publikacji I, Doktorantka wykazała, że białko grochowe (komercyjne) może być alternatywą dla żelatyny w produkcji kapsulek, co było manifestowane przez wyższą rozpuszczalność, niższą higroskopijność, oraz wyższą stabilność termiczną, oraz zbliżoną z żelatyną wydajnością koacerwacji i kapsułkowania oraz efektywnością enkapsulacji. Jednak, wprowadzenie emulgatora, spowodowało negatywny efekt, który związany był z m.in. z pogorszeniem wydajności kapsułkowania i stabilnością termiczną proszków. Omawiana publikacja, podobnie jak poprzednie, została przygotowana z należytą starannością i dbałością o szczegóły. Jednak, w omówieniu tej publikacji, Doktorantka popełniła dwa błędy. Pierwszy - treść podrozdziału dotyczy wykorzystania białka grochowego, a jego tytuł brzmi „*wykorzystanie białka owsianego*”. Drugi zaś - w Tabeli 2 przedstawione są sprzeczne wyniki efektywności kapsułkowania w porównaniu do wyników przedstawionych w publikacji II. W opracowaniu efektywność kapsułkowania przybiera wartości od 0,18 do 0,67 %, zaś w publikacji od 18 do 67 %. W opracowaniu wartości powinny zostać pomnożone przez 100, albo wydajność enkapsulacji nie powinna być podana w „%”.

W eksperymencie zaprezentowanym w publikacji III, Doktorantka wykorzystwała rozpuszczalną frakcję białka owsianego (substytut żelatyny) oraz olejek z owoców jałowca rozpuszczony w oleju z zarodków pszennych (rdzeń kapsułki). Plan doświadczenia stanowiło, wykonanie 13 wariantów mikrokapsulek, których zmiennymi niezależnymi były różne wartości pH mieszanin (kluczowa zmienna wpływająca na wydajność enkapsulacji) i różne udziały masowe białka owsianego w stosunku do gumy arabskiej, z kolei zmiennymi objaśnianymi wybrane parametry fizyko-chemiczne i chemiczne liofilizatów. Autorka wykazała, że wprowadzenie białka owsianego, jako składnika koacerwatu, generowało zadowalającą stabilność termiczną mikrokapsulek, a także dobrą rozpuszczalność (>80 %). Jednak, zauważyła, że pogorszyła się (w stosunku np. do koacerwatów z żelatyną i białkiem grochowym) wydajność enkapsulacji. Co więcej, w oparciu o metodę powierzchni odpowiedzi, Autorka zoptymalizowała proces koacerwacji i wykazała, że najkorzystniejszą wydajność enkapsulacji (26,61 %), rozpuszczalność (83,64 %) oraz indeks polidispersyjności (0,66) uzyskuje się, stabilizując pH mieszaniny do 2,59 oraz wykorzystując udział OP:GA na poziomie 61,61 %.

Ostatnią publikację Doktorantki tworzą badania, w których oceniano proces koacerwacji i jakość mikrokapsulek wytworzonych w układzie białko bobowe:polisacharydy z nasion chia, zawierających olejek jałowcowy lub czarnego pieprzu, rozpuszczonych w oleju rzepakowym lub sojowym. Układ eksperymentalny oraz mierzone parametry są analogiczne jak w publikacjach I i II. Doktorantka wykazała, że wprowadzenie polisacharydy z nasion chia oraz białko bobowe, powoduje uzyskanie wydajności enkapsulacji na poziomie 65,64 – 87,85 %, na którą istotnie wpływał jedynie udział FB/CHP oraz interakcja między rodzajem wykorzystanego olejku a stosunkiem

FB/CHP. Największą wydajność enkapsulacji oraz największą stabilność termiczną stwierdza się przy stosunku 1:2. Co więcej, zanotowała korelację, mówiącą o tym, że zawartość wody w mikrokapsułkach generuje większą higroskopijność i mniejszą gęstość cząstek. Moją ciekawość budzi wykorzystanie emulgatora Tween 80 do tworzenia koacerwatu.

- U4. Autorka w publikacji II, wykazała, że dodatek Tween 80 powoduje pogorszenie wydajności enkapsulacji i jakości kapsułek. Nasuwa się zatem pytanie, jaki był cel dodania 0,5 % Tween 80 do koacerwacji w układzie FB/CHP. Czy pominięcie Tween 80 nie poprawiłoby jakości koacerwatów?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, chciałbym podkreślić, że badania prowadzone przez mgr inż. Alicję Kizildag zostały zaplanowane w bardzo przemyślany i konsekwentny sposób, co stanowi niezbity dowód świadczący o dużej wiedzy Doktorantki, jej doświadczeniu w prowadzeniu badań i dojrzałości naukowej, mimo wskazanych uwag. Tematyka podjętych badań jest nowatorska i oryginalna, ważna z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Zważywszy na innowacyjność podjętych badań oraz mnogość zastosowanych technik analitycznych, co przewyższa zwyczajowe wymogi prac doktorskich, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr inż. Alicji Kizildag pt. „*Białka roślinne w mikrokapsułkowaniu olejków eterycznych z wykorzystaniem koacerwacji złożonej*” spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr inż. Alicji Kizildag do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rzeszów, 2.12.2024 r.



Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Technologii Żywności i Żywienia
Zakład Chemii i Toksykologii Żywności
ul. Źwiklińskiej 1, 35-601 Rzeszów
tel.: + 48 17 872 17 20, + 48 17 872 16 19
e-mail: chof@ur.edu.pl

OPŁATA POBRANA
TAXE PERÇUE - POLOGNE
Umowa z Poczta Polska S.A.
nr UWP/70/2024

PRIORITET
PRIORITAIRE

No 2 Cz

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW
2024 -12- 04
WPLYNEŁO DNIA -8-



(00)659007734932200315



(00)659007734932200315



Poczta Polska

Opłata pobrana _____ zł _____ gr

2024

INSTYTUT NAUK O ŻYWIENIU ORZOWIEKA
SEKRETARIAT
SZKOTA BRÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO
UL. NOWOURSYNOWSKA 159C
02 - 776 WARSZAWA

R