

Prof. dr hab. Wanda Kociuba  
Instytut Genetyki Hodowli  
i Biotechnologii Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, dn. 05.12.2019

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Moniki Dynkowskiej

pt. **” Profil substancji fenolowych i struktury arabinoksylianów ziarna żyta (*Secale cereale*) oraz ich związek z potencjałem prozdrowotnym chleba”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Renaty Cyran w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin IHAR –PIB w Radzikowie.

Ziarno zbóż jest jednym z podstawowych surowców roślinnych wykorzystywanych w przemyśle spożywczym. Wyjątkowość tego surowca wynika nie tylko z zawartości niezbędnych składników pokarmowych, mających znaczenie w zaspokajaniu podstawowych potrzeb żywieniowych człowieka, ale również z zawartości wielu substancji nadających charakter prozdrowotny otrzymanym z nich produktom. Wśród tzw. związków prozdrowotnych pochodzenia roślinnego, substancje fenolowe i arabinoksylanty odgrywają znaczącą rolę, są one składnikami błonnika pokarmowego. Spożywanie zatem produktów bogatych we włókno pokarmowe może być jednym z czynników prewencyjnych dla występowania chorób cywilizacyjnych. Ziarno żyta w porównaniu do innych zbóż zawiera największą ilość rozpuszczalnego błonnika pokarmowego, o dużej lepkości i dużym potencjale antyoksydacyjnym. Właściwości te zależą z kolei od koncentracji arabinoksylianów i stopnia ich usieciowania przez kwasy fenolowe. Procesy technologiczne mogą mieć wpływ na ich biodostępność. Ze względu na brak takich badań i doniesień w literaturze, Doktorantka pojęła badania mające na celu porównanie metody przygotowania ciast chlebowego z mąki różnych odmian żyta na biodostępność substancji fenolowych, co

jest związane ze strukturą i usieciowaniem arabinoksylantów. Przedstawione przez Doktorantkę kompleksowe wyniki badań są interesujące z punktu widzenia zarówno konsumentów jak i producentów pieczywa. Uważam, że przeprowadzone badania dobrze wpisują się w aktualny trend nauk o żywności, dotyczący m.in. zawartości i oddziaływania składników ziarna żyta na proces technologiczny z uwzględnieniem potencjału prozdrowotnego otrzymanych produktów. Przeprowadzone badania dostarczają nowej wiedzy, która pozwala na wyjaśnienie związku między technologią przygotowania ciasta do wypieku chleba żytniego, a kształtowaniem się lepkości otrzymanego produktu.

### **Ocena pracy pod względem formalnym**

Przedstawiona do oceny praca jest opracowaniem liczącym 221 stron. Układ pracy jest zgodny z powszechnie przyjętymi wymaganiami dla rozpraw doktorskich o charakterze eksperymentalnym. Struktura podziału treści kolejnych rozdziałów jest następująca: Wprowadzenie – 4 strony, Przegląd literatury – 20 stron, Cel pracy- 2 strony, Materiał i metody- 17 stron, Wyniki- 55 stron, Dyskusja- 32 strony, Podsumowanie i wnioski – 4 strony oraz Bibliografia – 13 stron. W pracy zawarto także treści nie wydzielone jako rozdziały: spis treści, aneks A dotyczący spisu tabel (34 tabele), aneks B dotyczący nazw i wzorów związków wyszczególnionych w przeglądzie literatury (9 tabel), aneks C dotyczący wykazu dorobku naukowego oraz streszczenia w języku polskim i angielskim i wykazu skrótów i symboli używanych w tekście pracy. Na podkreślenie zasługuje obszerny rozdział wyniki badań i dyskusja, które obejmują ok 50 % treści opracowania. Doktorantka do opracowania wykorzystywała 275 pozycji literatury, w większości obcojęzycznych, co ugruntowało Jej wiedzę dotyczącą tematyki badawczej, a także pozwoliło na porównanie wyników badań z innymi autorami.

Pod względem językowym praca napisana jest poprawnie, można doszukać się niewielu błędów stylistycznych, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Na podkreślenie zasługuje bardzo staranne przygotowanie tabel i rysunków.

### **Merytoryczna ocena pracy**

Uważam, że tematyka badawcza Doktorantki zakończona napisaniem rozprawy doktorskiej jest interesująca o dużym znaczeniu poznawczym, gdyż jest znaczącym uzupełnieniem współczesnej nauki o żywności. Wyniki badań mogą mieć istotne znaczenie



dla właściwego i szerszego wykorzystania ich w przetwórstwie, a także przy otrzymywaniu nowych odmian w praktycznej hodowli.

W rozdziale Wprowadzenie została opisana charakterystyka związków prozdrowotnych zbóż, ze szczególnym uwzględnieniem żyta, co jest dobrym wprowadzeniem w tematykę przeprowadzonych badań. Następny rozdział Przegląd literatury został podzielony na 3 podrozdziały które obejmowały szczegółową charakterystykę dotyczącą: substancji fenolowych ziarna żyta; arabinoksylianów ziarna żyta; oraz technologii wypieku chleba żytniego. W każdym z tych podrozdziałów zostały bardzo szczegółowo opisane elementy ich struktury i funkcji. W podrozdziale Technologia wypieku chleba żytniego, zwrócono uwagę na bardzo ważny parametr jakości mąki, jakim jest liczba opadania, który w bardzo prosty i szybki sposób pozwala określić zdolność kleikowania skrobi i jej podatność na działanie enzymów amylolitycznych. Parametr ten jest wykorzystywany w ocenie materiałów hodowlanych i służy do ich selekcji dla otrzymania odmian o dobrych wartościach wypiekowych. Jak wynika z danych przedstawionych przez Doktorantkę wartość lepkości wodnego ekstraktu maki żytniej może również być istotnym parametrem selekcyjnym przydatności odmian do wypieku chleba. Do badań Doktorantka wykorzystwała ziarno 7 odmian żyta, pochodzące tylko z jednego zbioru (rok 2012) i z jednej stacji hodowlanej. Brakuje krótkiej informacji na temat wybranych odmian, czym kierowano się przy ich wyborze i co było powodem badania ziarna tylko ze zbioru jednego roku W rozdziale Materiał i metody str.47 podano, że do badań wykorzystano 70 prób chlebowych, które wynikają z liczby odmian, przemiału maki i metod przygotowania ciasta, natomiast w streszczeniu (str.9) podano że materiał do badań stanowiły 84 próby, skąd wynika ta nieścisłość? Uważam, że należałoby zamieścić tabelę obrazującą wszystkie badane kombinacje prób.

Zastosowane metody analityczne w realizacji badań były właściwe, obejmowały podstawowe metody stosowane do oceny właściwości wypiekowych oraz zaawansowane techniki analityczne. Za cenne uważam zastosowanie nowoczesnych technik chromatograficznych do określania zawartości i właściwości arabinoksylianów i kwasów fenolowych. Świadczy to o dużej wiedzy i dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowo-badawczej. Przedstawiona metodyka badań jest dość obszerna, obejmuje 17 stron i przedstawia wykaz stosowanej aparatury do analiz, metodykę przygotowania maki i ciasta oraz próbny wypiek, przygotowania prób mąki do izolacji frakcji błonnika, ekstraktów buforowych i alkoholowych mąki i chleba, izolacji ogólnej frakcji arabinoksylianów oraz

frakcjonowania izolatów arabinoksylantów. W dalszej części metodyki Doktorantka opisała stosowane metody analityczne związane z oznaczeniem wilgotności prób, zawartości popiołu oraz kwasowości ekstraktu chlebowego, oznaczenie amylograficzne i liczby opadania, zawartości skrobi, aktywności enzymów endogennych, parametrów potencjału antyoksydacyjnego. Zaawansowane techniki analityczne obejmowały metodykę identyfikacji związków bioaktywnych metodą dwuwymiarowej chromatografii gazowej, wyznaczenie mas molekularnych arabinoksylantów metodą wysokosprawnej chromatografii, analizy strukturalnej arabinoksylantów metodą magnetycznego rezonansu protonów oraz oznaczenia zawartości kwasów uronowych. Wyniki badań zamieszczone w pracy pochodziły z badań finansowanych przez Narodowe centrum Nauki w ramach projektu OPUS 2. Część analiz wykonała Doktorantka w ośrodkach naukowo-badawczych w Warszawie, Łodzi i Francji, co było związane z jakością otrzymanych wyników przy wykorzystaniu nowoczesnej aparatury. Wyniki badań zostały opracowane statystycznie wykorzystując program STATISTICA do analizy wariancji, wyznaczenia grup jednorodnych, porównań wielokrotnych Tukeya oraz wyznaczenia współczynników zmienności i korelacji Pearsona. Mam jednak drobne uwagi i zapytania. Doktorantka używa w całej pracy wyrażenia „potencjał lepki chleba” lub „potencjał lepkościotwórczy” nie jest to prawidłowe, gdyż chleb jako taki nie podwyższa lepkości, tylko substancje zawarte w jego ekstrakcie. Może lepiej używać „potencjał wzrostu lepkości ekstraktu”?. Podobnie na str.51 wyrażenie „składowe lepkościowe” jest również niewłaściwe. Na str. 46 w spisie aparatury nie podano amylografu Brabendera, który używano do oznaczenia amylograficznego i liczby opadania str. 50 po. 4.2.2 W wykazie używanych skrótów brak jest skrótu „A.U.” jako jednostki lepkości przy pomiarze amylografem. Należałoby również podać w jakiej jednostce jest podawana lepkość i scharakteryzować jakie fizyczne znaczenie ma ta jednostka. W pozycji 4.2.3 (str.51) do oznaczenie lepkości ekstraktu wodnego i buforowego stosowano różne szybkości ścinania (8 lub 3 lub 30 rpm). W związku z tym, że lepkość zależy od szybkości ścinania czy wyniki będą porównywalne. W celu izolowania arabinoksylantów Doktorantka stosowała procedurę enzymatycznego rozkładu przy pH 6,8 str. 49 . Zastosowane warunki nie symulują takich jakie występują w przewodzie pokarmowym (niskie pH żołądka, występowanie innych enzymów-pepsyna), co może mieć wpływ na zawartość i strukturę tych związków. Stosowanie biochemicznej metody oczyszczania nie do końca odzwierciedla metodę *in vivo* w przewodzie pokarmowym. Identyfikację związków bioaktywnych (p.4.2.10 str.60) wykonano dla odmiany Diament, nasuwa się pytanie dlaczego wybrano tą odmianę?.



W rozdziałach Wyniki badań i Dyskusja Doktorantka zestawiała bardzo starannie w tabelach oraz na rysunkach wyniki poszczególnych etapów badań, które zostały podzielone na 7 podrozdziałów. Tabele i rysunki zamieszczone w tekście pracy i w załączonym aneksie są przedstawiony w sposób czytelny i staranny. Wyniki badań rozpoczęto od charakterystyki jakościowej, fizykochemicznej i biochemicznej mąki odmian żyta pod względem parametrów mających wpływ na wartość wypiekową. Uzyskane wyniki badań potwierdzają wartość liczby opadania jako pośredniego parametru podatności skrobi na działanie enzymów amylolitycznych, który może być wykorzystany do określenia przydatności mąki żytniej do wypieku. Doktorantka używa wyrażenia „mąki wyselekcjonowanych odmian”, jeśli dokonano selekcji to w oparciu o jakie parametry, może lepiej używać „badanych odmian”. Innym przykładem jest użycie „sezon hodowlany” który jest niewłaściwy, gdyż chodzi o sezon wegetacyjny roślin. W odniesieniu do badań aktywności enzymatycznej, która może być jednym z wyróżników jakości mąki, stwierdzono że zależała ona od stopnia przemiału ziarna. Zdecydowanie większe wartości uzyskano dla mąki całościarnowej, co potwierdza ich lokalizację w warstwie aleuronowej. Badane odmiany były zróżnicowane w odniesieniu do aktywności enzymatycznej, co daje możliwości wyboru odmian o lepszej jakości wypiekowej. Dalsza charakterystyka 2 rodzajów mąki badanych odmian dotyczyła lepkości ekstraktu, zawartości polisacharydów błonnika pokarmowego, zawartości związków fenolowych oraz określono potencjał antyoksydacyjny. Wyniki tych badań zostały szczegółowo opisane w pracy ze zwróceniem uwagi na zależność tych parametrów w odniesieniu do badanych odmian.

Kolejny etap badań Doktorantki dotyczył wpływu metody przygotowania ciasta na biodostępność kwasów fenolowych oraz na potencjał antyoksydacyjny chleba. Wyniki badań wykazały, że na biodostępność kwasów fenolowych wpływał poziom kwasowości jak i czas fermentacji ciasta. Duże znaczenie w biodostępności kwasów fenolowych miały właściwości odmiany do zastosowanej metodologii przygotowania ciasta chlebowego. Stwierdzono, że dla niektórych odmian korzystniejsze są metody bezpośredniego wypieku bez wcześniejszego zakwaszania, inne wymagają dodatku natywnego startera i zróżnicowanego czasu fermentacji, a inne, jak odmiana Horyzo wykazała zwiększoną biodostępność związków fenolowych niezależnie od metody przygotowania ciasta. Wyniki badań Doktorantki wykazały że spośród pięciu różnych metod przygotowania ciasta żytniego, zastosowanie metody bezpośredniej z dodatkiem kwasu mlekowego wpływało na najwyższą biodostępność związków o charakterze antyoksydacyjnym zawartych w chlebie z mąki całościarnowej. Metoda ta wpływała

korzystnie na niskie pH ciasta, które z kolei wpływa na kwasową hydrolizę związków fenolowych. Inne metody zastosowane w badaniach miały wpływ na zwiększoną dostępność antyoksydantów o niższej polarności. Uzyskane wyniki badań potwierdziły, że potencjał wzrostu lepkości ekstraktu, który zależy od zawartości struktury makromolekularnej arabinoksylantów rozpuszczalnych, w dużym stopniu zależał od odmiany.

Na podkreślenie zasługują szeroko zakrojone badania właściwości i składu mąki żytniej. Zwłaszcza dużą wartość poznawczą mają badania zawartości i struktury kwasów fenolowych i arabinoksylantów oraz ich wpływ na lepkość ekstraktu chlebowego, a także możliwość ich modyfikacji poprzez odpowiedni dobór technologii przygotowania ciasta. Doktorantka wyjaśniła także niektóre mechanizmy biodostępności kwasów fenolowych oraz niebiałkowych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych.

Wyniki wszystkich etapów badań zostały przez Doktorantkę wyczerpująco omówione, a ich dyskusja z danymi literaturowymi była wnikliwa. Została ona przeprowadzona w sposób dojrzały i rzeczowy, co świadczy o dużej wiedzy i dokładności badawczej.

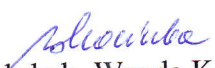
Wyniki badań zostały podsumowane w 12 wnioskach, będących odpowiedzią na postawiony cel badawczy. Mam uwagę do wniosku 10 i 11 w których Doktorantka pisze że wysoki potencjał antyoksydacyjny i wysoki potencjał lepki chleba są warunkowane przez odmianę. Lepszym wyrażeniem byłoby: „odmiany różnią się pod względem tej cechy, a najwyższą wartość potencjału antyoksydacyjnego chleba stwierdzono dla odmiany Stanko”. Odmiana jest określonym genotypem wynikającym z techniki hodowlanej, która korzysta najczęściej z układów rekombinacji genów powstałych z krzyżowania materiału wyjściowego i różnego rodzaju współdziałania genów. Ten nowy skład genetyczny różnicuje odmiany pod względem wielu cech użytkowych, dlatego stwierdzenie różnic międzyodmianowych daje informacje hodowcom, że w wyniku prac hodowlanych można otrzymać odmiany o lepszych wartościach jakościowych wpływających na wartość wypiekową i prozdrowotną pieczywa żytniego.

### **Wniosek końcowy**

**Stwierdzam, że rozprawę doktorską Pani mgr Wioletty Moniki Dynkowskiej zatytułowaną " Profil substancji fenolowych i struktury arabinoksylanów ziarna żyta (*Secale cereale*) oraz ich związek z potencjałem prozdrowotnym chleba" należy uznać za samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy wykorzystaniu adekwatnej i**



nowoczesnej metodyki, co jest warunkiem ustawowym stawianym rozprawom doktorskim (Ustawa z 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki Dz.U. z 2017r poz. 1789). Doktorantka dowiodła poprzez napisaną rozprawę doktorską, że ma dużą wiedzę z zakresu technologii żywności oraz umiejętność stosowania tradycyjnych i nowoczesnych metod badawczych, co wskazuje na dobre przygotowanie do prowadzenia badań naukowych. Praca wnosi wiele elementów poznawczych, które mogą być wykorzystane w praktycznej hodowli nowych odmian, a także w przemyśle piekarniczym. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Naukowej IHAR-PIB o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr Wioletty Moniki Dynkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Prof. dr hab. Wanda Kociuba