

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

mgr Wioletta Monika Dynkowska

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

The profile of phenolic compounds and structure of arabinoxylans of rye grain (*Secale cereale* L.) and their impact on bread health properties

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Summary of doctoral thesis

Promotor: dr hab. Małgorzata Renata Cyran

Promotor pomocniczy: dr hab. Krystyna Rybka

Recenzenci:

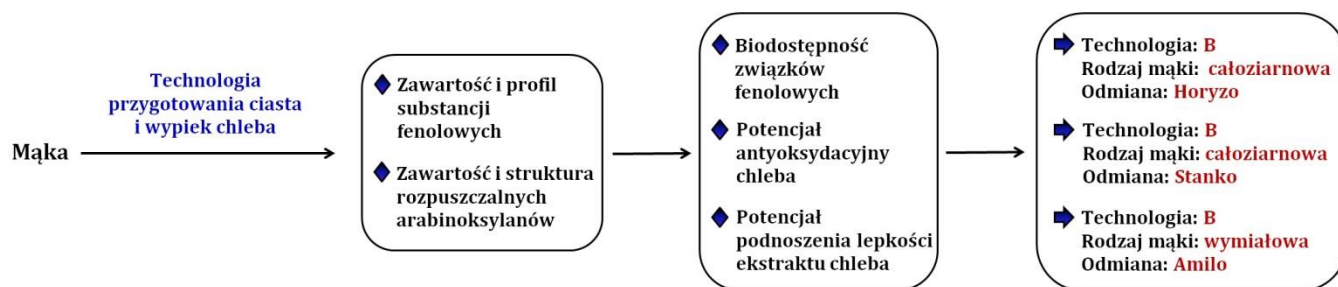
prof. dr hab. Wanda Kociuba

prof. dr hab. Jan Michniewicz

Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy pochodzą z badań finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki na podstawie decyzji nr DEC-2011/03/B/NZ9/00116 w ramach projektu OPUS 2 „Badanie mechanizmów modyfikacji struktury arabinoksylianów w układach modelowych chleba żytniego, jej wpływ na zdolność chleba do tworzenia lepkich roztworów oraz potencjał antyoksydacyjny” realizowanego w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin w latach 2012-2015.

Radzików, 2020

ABSTRAKT



1. WPROWADZENIE

W dobie nasilającego się występowania chorób cywilizacyjnych, przede wszystkim chorób układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy, otyłości oraz chorób nowotworowych, dieta bogata w produkty o wysokiej zawartości błonnika pokarmowego stanowi jeden z ważniejszych czynników prewencyjnych. Spośród zbóż ziarno żyta zawiera największą ilość rozpuszczalnego błonnika pokarmowego o wysokiej lepkości i wysokim potencjale antyoksydacyjnym, właściwościach zależnych od koncentracji i cech strukturalnych upłynnianych w procesie trawienia *in vitro* arabinoksylianów (Izydorczyk i Biliaderis, 1995).

Arabinoksyliny są podstawowym składnikiem błonnika pokarmowego (Hansen i in., 2003) a miejscem ich działania jest jelito cienkie oraz okrężnica. Po spożyciu pokarmu bogatego w błonnik polimery te mają zdolność do adsorbowania wolnych rodników, jonów metali ciężkich oraz toksyn, tym samym chroniąc biomolekuły komórkowe (DNA, lipidy i białka) przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, zmniejszając ryzyko powstawania niektórych chorób przewlekłych i nowotworowych (Cummins, 1984; Roehring, 1998). Z właściwości fizykochemicznych błonnika wynika również zdolność do podnoszenia lepkości treści pokarmowej w jelicie cienkim a przez to spowalnianie trawienia i wchłaniania składników pokarmowych, co skutkuje stabilizacją stężenia glukozy, insuliny i cholesterolu we krwi (Jenkins i in., 2004).

Główną część, 65 – 90%, frakcji kwasów fenolowych stanowi kwas ferulowy a jego zawartość w ziarnie żyta wynosi ok. 1 mg·g⁻¹ s.m. (Rybka i in., 1993). Kwasy fenolowe ziarna zbóż występują przeważnie w formie koniugatów niskocząsteczkowych oraz związane z arabinoksylianami włókna pokarmowego, głównie poprzez wiązanie estrowe z α -L-arabinofuranozą oraz rzadziej, wiązaniem eterowym z ligniną. Ziarno zbóż zawiera również struktury di-, tri- i tetrameryczne, które powstają w obecności nadtlenu wodoru w reakcjach rodnikowych katalizowanych przez peroksydazę w czasie syntezy ścian komórkowych (Bunzel i in., 2005). Pomimo, że właściwości antyoksydacyjne kwasów fenolowych i cząsteczek diferulowych są *in vivo* kontrolowane przez wiele czynników, to najważniejszym z nich jest ich biodostępność, na którą decydujący wpływ ma struktura i usieciowanie arabinoksylianów a także procesy technologiczne przetwarzania ziarna modyfikujące strukturę i właściwości fizykochemiczne arabinoksylianów oraz kwasów fenolowych.

Jednym ze wskaźników poprawy biodostępności arabinoksylianów i kwasów fenolowych w chlebie żytnim jest wzrost ilości form rozpuszczalnych. W zasadzie brak jest doniesień literaturowych na temat wpływu procesu przygotowania ciasta i wypieku chleba na biodostępność kwasów fenolowych. Celem niniejszej pracy było porównanie wpływu metody przygotowania ciasta chlebowego z mąki różnych odmian żyta, o różnym stopniu wymiału, na biodostępność substancji fenolowych oraz lepkość ekstraktów buforowych i uzyskanych w procesie trawienia *in vitro*.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy opisują modyfikacje arabinoksylianów usieciowanych kwasami fenolowymi w wyniku zastosowania trzech podstawowych technologii przygotowania ciasta żytniego: bezpośredniej bez dodatku oraz z dodatkiem kwasu mlekowego oraz trójfazowej fermentacji z natywnymi starterami. Zawierają one elementy nowej wiedzy, która pozwala na lepsze zrozumienie związku pomiędzy technologią przygotowania ciasta do wypieku chleba żytniego a potencjałem podnoszenia lepkości i antyoksydacyjnym otrzymanego pieczywa.

2. CEL I HIPOTEZA BADAWCZA

Celem prowadzonych badań było zbadanie wpływu metody przygotowania ciasta, rodzaju mąki oraz odmiany żyta na biodostępność substancji fenolowych w chlebie żytnim, jego potencjał antyoksydacyjny oraz lepkość frakcji rozpuszczalnych *in vitro*.

Aby wyjaśnić naturę obserwowanych zależności i wskazać technologię pozwalającą na najbardziej efektywne upłynnianie frakcji o wysokiej lepkości i maksymalnym potencjale antyoksydacyjnym do wypieku chleba eksperymentalnego zastosowano pięć metod przygotowania ciasta, dwa rodzaje mąki żytniej (całozbiorna i wymiałowa), oraz siedem odmian żyta. We frakcjach upłynnionych w warunkach procesu technologicznego zbadano zmiany: koncentracji i profilu kwasów fenolowych, szczegółowej charakterystyki pozostałych antyoksydantów a także dystrybucji masy cząsteczkowej arabinoksylianów błonnika pokarmowego, ich struktury i stopnia usieciowania.

Hipoteza naukowa: Istnieją metody przygotowania ciasta żytniego do wypieku oraz odmiany żyta, które pozwalają na osiągnięcie maksymalnego potencjału lepkiego lub/ oraz antyoksydacyjnego pieczywa.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

Materiał badawczy stanowiły następujące zestawy prób:

- 14 mąk z ziarna siedmiu odmian żyta ze zbioru w 2012 roku w stacji Hodowli Roślin DANKO Sp. z o.o., oraz 70 wypieczonych z nich chlebów według eksperymentalnych procedur prof. Alicji Ceglińskiej, opisywanych w Tab. 3.1.1.
- Frakcje i subfrakcje arabinoksylianów wyizolowane z wybranych prób mąki i chleba (Cyran i Saulnier, 2012) poprzez sukcesywne wytrącanie subfrakcji arabinoksylianowych pod wpływem zwiększającego się poziomu nasycenia siarczanu (VI) amonu w roztworze.

Tabela 3.1.1.

Schemat procedur przygotowania ciasta i wypieku chleba z mąki żytniej całozbiornej oraz wymiałowej.

Metoda/Oznaczenie chlebów	Metody bezpośrednie				Metody pośrednie							
	Procedura		A		B		C		D		E	
Składnik	C	W	C	W	C	W	C	W	C	W	C	W
Etap I												
Mąka [g]	-	-	-	-	50	50	50	50	50	50	50	50
Woda [ml]	-	-	-	-	150	100	150	100	150	100	150	100
Czas fermentacji w 30°C [godz.]	-	-	-	-	12	12	24	24	24	48	48	48
Etap II												
Starter natywny [g]	-	-	-	-	150	150	150	150	150	150	150	150
Mąka [g]	-	-	-	-	150	150	150	150	150	150	150	150
Woda [ml]	-	-	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100
Drożdże piekarskie [g]	-	-	-	-	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Czas fermentacji w 30°C [godz.]	-	-	-	-	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Etap III												
Zakwas [g]	-	-	-	-	400	400	400	400	400	400	400	400
Mąka [g]	400	400	400	400	300	300	300	300	300	300	300	300
Woda [ml]	320	288	314	282	160	160	160	160	160	160	160	160
Kwas mlekowy 50% [ml]	-	-	5.6	5.6	-	-	-	-	-	-	-	-
Drożdże piekarskie [g]	1.4	1.4	1.4	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-
Sól [g]	8.0	8.0	8.0	8.0	10	10	10	10	10	10	10	10
Czas fermentacji w 30°C [godz.]	3	3	3	3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Po włożeniu do formy												
Czas leżakowania w 30°C [godz.]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Wypiek [godz.]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Objaśnienia: C – mąka całozbiorna; W – mąka wymiałowa.

3.2. Metody analityczne

Do oznaczeń analitycznych zastosowano metody aprobowane przez Association of Official Analytical Communities (AOAC).

Analit	Metoda oznaczania
Wilgotność	Grawimetrycznie AACC 44-15A
Popiół	Grawimetrycznie AOAC 923.03
Kwasowość ekstraktu chlebowego (pH)	Elektroanalitycznie; pehametr Microcomputer pH-meter CP-315 (Elmetron, Zabrze, Polska).
Lepkość kleiku	Amylograficznie; Amylograph (Brabender Instruments, Duisburg, Niemcy); Polska Norma PN-ISO 7973:2001

skrobiowego	
Temperatura kleikowania	Amylograficznie; Amylograph (Brabender Instruments, Duisburg, Niemcy); Polska Norma PN-ISO 7973:2001
Liczba opadania	Falling Number 1400 (Perten Instruments); Polska Norma PN-EN ISO 3093:2007
Lepkość ekstraktu wodnego	Wiskozymetrycznie; wiskozymetr płytkowo-stożkowy Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer z termostatowaną miseczką pomiarową
Aktywność endo- β -D-ksylanazy	Kolorymetrycznie; Xylanase Assay Kit (Xylazyme AX; K-XYLS; Megazyme, Wicklow, Irlandia) oraz Hansen i in., 2002; Fazary i Ju, 2007; Rasmussen i in. 2001 z modyfikacjami Cyran i in. 2012
Aktywność α -L-arabinofuranozydazy	Kolorymetrycznie; Rasmussen i in. 2001 oraz Cleemput i in. 1995 z modyfikacjami Cyran i in., 2012
Aktywność β -D-ksylozydazy	Kolorymetrycznie; Rasmussen i in. 2001 oraz Cleemput i in. 1995 z modyfikacjami Cyran i in., 2012
Aktywność esterazy ferulanowej	Chromatograficznie; RP-HPLC; Hansen i in., 2002; Fazary i Ju, 2007; Rasmussen i in. 2001
Skrobia z zawartością amylozy	Kolorymetrycznie; Amylose / Amylopectin Assay Kit (K-AMYL; Megazyme, Wicklow, Irlandia)
Kwasy uronowe	Kolorymetrycznie; Scott 1979
Potencjał redukcyjny	Kolorymetrycznie; Shahidi i Naczek, 1995 z modyfikacjami Michalska i Zieliński, 2006
Potencjał antyoksydacyjny	Kolorymetrycznie; Re i in. 1999, Brand-Williams i in. 1995, Superoxide Dismutase Assay Kit (SD125; Ransod, Crumlin, Wielka Brytania)
Polisacharydy nieskrobiowe	Chromatograficznie; GC-FID; Englyst i in. 1994
Kwasy fenolowe i dehydromery kwasu ferulowego	Chromatograficznie; RP-HPLC; Liyana-Pathirana i Shahidi 2006 z modyfikacjami; GC-FID; Englyst i in. 1994 oraz Li i in. 2001; GC \times GC \times ToF MS (PŁ) Bonikowski i in. 2016
Masy molekularne arabinoksylianów	Chromatograficznie; HP-SEC (INRA, Nantes, Francja), Cyran i Saulnier, 2012
Struktury izolatów arabinoksylianowych	Spektrometrycznie; ^1H - NMR (UW), Cyran i Saulnier, 2012
Analiza statystyczna	STATISTICA (StatSoft Poland, Kraków, Polska), MS Office – Excell

4. WYNIKI I Dyskusja

4.1. Wpływ metody przygotowania ciasta i odmiany żyta na biodostępność kwasów fenolowych i dehydromery kwasu ferulowego w otrzymanym chlebie

Kierunek zmian biodostępności określonych grup związków fenolowych jest determinowany różnorodnością procesów zachodzących podczas przygotowania ciasta żytniego oraz ich wzajemnym natężeniem. Fermentacja ciasta prowadzona przy użyciu bakterii kwasu mlekowego lub / i drożdży jest nieodłącznym procesem podczas produkcji chleba żytniego i zależnym od szeregu czynników (Gobbetti, 1998, Hammes i in., 2005). Ważnym parametrem warunkującym stopień oraz tryb hydrolizy form związanych kwasów fenolowych jest wartość pH ciasta żytniego, która w niniejszej pracy odzwierciedlana jest wartością pH otrzymanego chleba. Wartości pH ekstraktów wodnych chleba żytniego całościarnowego i wymiałowego zawierały się w przedziale odpowiednio 4.54 – 6.23 i 3.94 – 6.08 odpowiednio dla chlebów całościarnowych (98% wymiału) i wymiałowych (62 – 64%, dla Amilo 57% wymiału) i były znacznie niższe niż pH ekstraktów mąk wyjściowych (6.49 – 6.68). Najniższą wartością pH charakteryzowały się chleby B, otrzymane metodą bezpośrednią z dodatkiem kwasu mlekowego.

Głównymi grupami fenoli biodostępnych były związane z frakcją rozpuszczalną arabinoksylianów kwasy fenolowe (KF) oraz dehydromery kwasu ferulowego (DiFA). Suma tych dwóch grup zawierała się w przedziale od 56% dla chlebów D do 67% dla chlebów B (chleby całościarnowe) i od 73% dla metody D do 80% dla metody A (chleby wymiałowe) całkowitej ilości biodostępnych związków fenolowych. Sumaryczna zawartość wolnych KF i DiFA w chlebach uległa co najmniej trzykrotnemu zwiększeniu w odniesieniu do mąk wyjściowych a maksymalny wzrost zawartości związków tej frakcji odnotowano dla metod A i C. Obniżenie pH ciasta w najmniejszym stopniu zwiększało zawartość KF tej frakcji, natomiast wydłużona fermentacja skutkowała konwersją KF do ich winylowych pochodnych przez mikroorganizmy obecne w zakwasie (Donaghy i in., 1999; Rodríguez i in., 2008; Gänzle, 2014). Ilość KF występujących w postaci koniugatów w chlebach uległa nieznacznemu zmniejszeniu. Ogólna zawartość koniugatów KF w chlebach całościarnowych była ujemnie skorelowana z aktywnością β -D-ksylozydazy i α -L-arabinofuranozydazy, natomiast w chlebach wymiałowych dodatkowo z aktywnościami endo- β -D-ksylanazy oraz esterazy ferulanowej w mące wyjściowej. Równoczesne zwiększenie ilości frakcji wolnej KF sugerował, iż koniugaty estrowe tych związków były substratem w hydrolizie prowadzonej przez enzymy występujące w mąkach. We frakcji arabinoksylianów rozpuszczalnych w chlebach całościarnowych dominującym związkiem fenolowym był kwas ferulowy, na którego zawartość miała wpływ aktywność endo- β -D-ksylanazy, podczas

gdy dla chlebów wymiałowych był to kwas synapowy. Zwiększyła się również zawartość DiFA we frakcji rozpuszczalnej arabinoksylianów, a ich zawartość w chlebach całościarnowych była ujemnie skorelowana z aktywnością α -L-arabinofuranozydazy w mące wyjściowej. Zwiększenie ilości biodostępnych związków fenolowych tej frakcji było skutkiem częściowej depolimeryzacji wysokocząsteczkowych nierozpuszczalnych arabinoksylianów podczas produkcji chleba zarówno na drodze hydrolizy kwasowej, jak i synergicznego działania enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę arabinoksylianów z esterazami kwasu cytrynowego (Peyrat-Maillard i in., 2003).

Biodostępność związków fenolowych była warunkowana technologią przygotowania ciasta oraz odmianą żyta (Tab. 4.1.1). Bezpośrednie przygotowanie ciasta żytniego bez dodatku kwasu mlekowego (A) powodowało istotne zwiększenie koncentracji wolnych KF w obydwu typach chleba, w odniesieniu do mąki wyjściowej oraz pozostałych typów chleba. Dodatek kwasu mlekowego (B) zapewniał maksymalną koncentrację KF skoniugowanych i związanych z rozpuszczalnym arabinoksylianem a także DiFA w chlebie całościarnowym. Metoda A bez dodatku kwasu mlekowego podnosiła również zawartość frakcji KF związanych z rozpuszczalnym arabinoksylianem chleba całościarnowego. Maksymalną ilość skoniugowanych KF w chlebie wymiałowym zapewniły metody B i D, z kolei metoda A skutkowała maksymalną ilością KF i DiFA związanych z rozpuszczalnym arabinoksylianem.

Wśród badanych odmian żyta pod względem zawartości KF w poszczególnych frakcjach najkorzystniej prezentowała się odmiana Horyzo, która determinowała maksymalną koncentrację wszystkich czterech grup fenoli biodostępnych w chlebie całościarnowym. W przypadku chleba wymiałowego, odmiana Diament zapewniła maksymalną ilość wszystkich wyżej wymienionych grup fenoli, ale obok niej odmiana Horyzo i Amilo skutkowały taką samą maksymalną ilością fenoli biodostępnych.

4.2. Wpływ metody przygotowania ciasta i odmiany żyta na potencjał antyoksydacyjny chleba

Potencjał antyoksydacyjny chleba w dużej mierze warunkowała obecność substancji stabilnych termicznie w warunkach działania wysokiej (250°C) temperatury w procesie wypieku chleba (Tab. 4.2.1). Ekstrakty chlebowe wykazywały zróżnicowane wartości zarówno potencjału redukcyjnego (PR_{FC}), jak również oraz zdolnością do neutralizacji kationorodnika ABTS⁺* ($\text{Act}_{\text{ABTS}^{+*}}$) i DPPH* ($\text{Act}_{\text{DPPH}^{*}}$) w stosunku do wartości PR_{FC} , $\text{Act}_{\text{ABTS}^{+*}}$ i $\text{Act}_{\text{DPPH}^{*}}$ mąk w zależności od rodzaju czynnika ekstrakcyjnego. Ekstrakty buforowe chleba charakteryzowały się wyższymi wartościami PR_{FC} oraz $\text{Act}_{\text{ABTS}^{+*}}$ niż ekstrakty sporządzone z 80% metanolu. Najwyższe wartości PR_{FC} wykazywały ekstrakty buforowe chlebów B. Stwierdzono występowanie licznych, statystycznie istotnych zależności pomiędzy wartościami PR_{FC} ekstraktów chleba a innymi parametrami aktywności antyoksydacyjnej tych ekstraktów. Wartości $\text{Act}_{\text{DPPH}^{*}}$ pieczywa żytniego były większe lub podobne dla obydwu rodzajów chleba. Różnice zdolności ekstraktów chleba do neutralizacji syntetycznych rodników, zależne od metody przygotowania ciasta do wypieku, nie miały odzwierciedlenia w zdolności tych ekstraktów do neutralizacji wysoce toksycznego naturalnego rodnika ponadtlenkowego O_2^{\cdot} . Wykazano, że wartości aktywności antyoksydacyjnej typu dysmutazy ponadtlenkowej SOD ($\text{Act}_{\text{SOD-t}}$) dla ekstraktów chleba były niższe o około 15% od ekstraktów mąki i zawierały się w bardzo wąskim zakresie bez względu na odmianę żyta, stopień wymiału mąki użytej do przygotowania ciasta chlebowego oraz metodę przygotowania ciasta. Uzyskane wyniki wskazywały na istotną rolę substancji obecnych w zewnętrznych warstwach ziarniaka w procesie antyoksydacyjnym. Występowanie ujemnych korelacji $\text{Act}_{\text{SOD-t}}$ z wartościami $\text{Act}_{\text{ABTS}^{+*}}$ oraz PR_{FC} dla ekstraktów chleba całościarnowego wskazywało na zaangażowanie tylko niektórych związków o charakterze antyoksydacyjnym w pełne spektrum reakcji przeciwrodnikowych a przyczyn należało upatrywać w strukturze cząsteczek antyoksydantów (Huang i in., 2005). Wskazywało to również na istnienie innego mechanizmu reakcji antyoksydacyjnej, mianowicie blokowanie enzymu generującego rodnik ponadtlenkowy a także chelatowanie jonów metali aktywnych wspomniane reakcje (Michalak, 2006).

Obniżenie pH chleba sprzyjało hydrolitycznemu uwalnianiu z matrycy roślinnej związków fenolowych, w szczególności KF, stanowiących o wartości PR_{FC} i $\text{Act}_{\text{ABTS}^{+*}}$. W zależności od polarności ekstrahenta mechanizm działania poszczególnych substancji antyoksydacyjnych różnił się. Działanie antyoksydacyjne mogło przebiegać zarówno na drodze reakcji redox, czyli poprzez transfer elektronowy, jak

i reakcji typu kwas-zasada, czyli transfer jonu wodorowego (Huang i in., 2005; Prior i in., 2005). Możliwa była także interakcja substancji antyoksydacyjnych obecnych w roztworze buforowym i wystąpieniem efektu synergicznego bądź eliminacja efektu antagonistycznego pomiędzy dwoma rodzajami antyoksydantów (Peyrat-Maillard i in., 2003). Wysoce prawdopodobne było również działanie innych reduktorów, niż kwasy fenolowe.

Wartości Act_{SOD-t} ekstraktów chleba całościarnowego korelowały z sumą KF zawartych w ekstrakcie ale również z zawartością i stopniem usieciowania arabinoksylianów rozpuszczalnych, podobnie jak wartości Act_{ABTS+*} korelowały ze stopniem arabinozylacji arabinoksylianów frakcji rozpuszczalnej obecnych w ekstrakcie. Spostrzeżenia te sugerowały czynny udział tych polimerów w akcji antyoksydacyjnej poprzez obecność wolnych grup hydroksylowych ksylopiranozy w łańcuchu arabinoksylianowym jako donorów atomów wodoru. Wystąpienie dodatkowej korelacji pomiędzy wartością Act_{ABTS+*} oraz PR_{FC} ekstraktów chlebów wymiiałowych a stopniem ferulacji arabinoksylianów frakcji rozpuszczalnej może świadczyć o aktywności antyoksydacyjnej grup ferulanowych związanych z arabinoksylianami. Te spostrzeżenia potwierdzają wcześniejsze badania (Malunga i Beta, 2015; Malunga i in., 2017).

Całkowita zawartość związków bioaktywnych zawartych w ekstraktach metanolowych mąki i chlebów korelowała z wartościami PR_{FC} . Największy wpływ na wartość PR_{FC} ekstraktu metanolowego miały substancje frakcji estrowej, w szczególności KF. Wartości PR_{FC} , Act_{SOD-t} i Act_{ABTS+*} ekstraktu buforowego uzależnione były silnie od sumy KF oraz ilości ketonów występujących we frakcji glikozydowej. Korzystny wpływ na wartość PR_{FC} mógł być spowodowany wzrostem koncentracji zarówno związków o charakterze antyoksydacyjnym uwalnianych z matrycy roślinnej, jak i metabolitów powstałych wskutek interakcyjnego działania enzymów drożdżowych i bakterii kwasu mlekowego na kwasy fenolowe (Donaghy i in., 1999; Rodríguez i in., 2008). Czynnikiem odpowiadającym za neutralizację rodnika O_2^* przez ekstrakty chleba mogły być również tokoferole, w szczególności α -tokoferol.

Zastosowanie metody B przygotowania ciasta istotnie zwiększało zarówno PR_{FC} obydwu ekstraktów chleba, jak i Act_{ABTS+*} w ekstrakcie buforowym. Metody A i C skutkowały jedynie zwiększonymi wartościami Act_{DPPH+*} ekstraktów metanolowych chleba całościarnowego, natomiast metoda D zwiększała wartość Act_{DPPH+*} w przypadku chleba wymiiałowego. Chleby całościarnowe otrzymane z odmiany Stanko wykazywały maksymalne wartości czterech spośród pięciu ocenianych parametrów (wykluczając Act_{SOD-t}). Na uwagę zasługują również odmiany Horyzo i Diament. W odniesieniu do chlebów wymiiałowych istotnie wyższe wartości tych parametrów stwierdzono dla odmian Diament, Stanko, Kier i Horyzo, jednakże każda z tych odmian żyta wykazywała swą przydatność w innym aspekcie zdolności antyoksydacyjnej.

4.3. Wpływ metody przygotowania ciasta i odmiany żyta na potencjał lepki chleba

Ekstrakty maleinowe chleba całościarnowego i wymiiałowego wykazywały wyższe wartości lepkości niż ekstrakty mąk wyjściowych, zróżnicowane w zależności od technologii przygotowania ciasta (Tab. 4.3.1). Ekstrakty chlebów wymiiałowych wykazywały wyższą wartość tego parametru (najwyższą dla metody B) niż analogiczne ekstrakty chlebów całościarnowych (najwyższa dla metody E). Wzrost lepkości ekstraktów chleba w porównaniu z wartościami tego parametru dla mąk spowodowany był zwiększeniem się udziału części rozpuszczalnej arabinoksylianów (ΔAX_r) z równoczesnym ubytkiem frakcji nierozpuszczalnej tych polimerów (ΔAX_{nr}) a zmiany te zależały zarówno od odmian, jak i od technologii zastosowanej do wypieku układów modelowych chleba. Zwiększenie ilości arabinoksylianów frakcji rozpuszczalnej spowodowane było zarówno użyciem kwasu mlekowego w procesie produkcji chleba żytniego w obydwu rodzajach chleba, jak i w mniejszym stopniu wydłużoną, 48 – godzinną fermentacją startera natywnego. Zjawisko to można wytłumaczyć zmianą struktury arabinoksylianów w chlebie całościarnowym pod wpływem działania kwasu mlekowego, o czym świadczyć może najniższy stopień arabinozylacji (Ara/Xyl) tych polimerów. Natomiast podobne wartości lepkości dla ekstraktów chlebów B i E chlebów wymiiałowych, obok hydrolytycznego działania kwasu mlekowego, były efektem niższej w porównaniu z mąkami całościarnowymi aktywności enzymów występujących w mące wymiiałowej.

Objaśnienia do tabel

W tabelach przedstawiono wartości średnich oraz rozkład grup jednorodnych wygenerowanych testem Tukeya dla określonych parametrów. Wartości zawarte w kolumnach, oznaczone różnymi literami, różnią się istotnie pomiędzy sobą. Śr. Kw. Odch. – średni kwadrat odchyień. * - $P \leq 0.05$, ** - $P \leq 0.01$. C – mąki i chleby całoziarnowe, W – mąki i chleby wmiatałowe.

Tabela 4.1.1.

Zawartość kwasów fenolowych w mąkach wyjściowych i układach modelowych chleba.

L.p.	p-Kumarowy		Ferulowy		Synapowy		Suma kwasów ^a		Suma dimerów		
	C	W	C	W	C	W	C	W	C	W	
Technologia											
Frakcja fenoli wolnych											
1	Mąka	0.43 e	0.46 d	3.70 f	2.95 f	1.33 d	0.73 c	8.96 f	5.48 e	-	-
2	Chleb A	3.68 a	1.32 a	41.77 a	15.18 a	10.31 b	3.04 a	69.57 a	24.22 a	-	-
3	Chleb B	2.63 b	1.19 b	20.90 c	6.56 d	5.66 c	0.84 c	38.66 d	11.32 d	-	-
4	Chleb C	2.57 b	0.92 c	36.58 b	13.54 b	11.29 a	2.51 b	62.98 b	20.74 b	-	-
5	Chleb D	1.19 c	0.51 d	18.64 d	9.48 c	10.53 ab	2.53 b	41.89 c	16.05 c	-	-
6	Chleb E	0.79 d	0.22 e	13.99 e	5.77 e	10.40 b	2.40 b	35.72 e	12.03 d	-	-
	Śr. Kw. Odch.	16.1	2.0	2025.8	224.0	155.8	9.5	4674.1	1464.0	-	-
	Statystyka F	906**	215**	6125**	2809**	387**	91**	2700**	1463**	-	-
Frakcja fenoli skoniugowanych											
1	Mąka	4.17 c	1.34 abc	47.89 b	20.77 a	89.02 b	23.32 a	150.63 b	49.68 a	-	-
2	Chleb A	4.23 bc	1.60 a	44.78 c	17.14 cd	88.55 b	18.75 c	144.52 bc	40.67 c	-	-
3	Chleb B	4.80 a	1.45 ab	51.26 a	18.21 b	95.92 a	20.61 b	162.37 a	44.64 b	-	-
4	Chleb C	4.60 ab	1.10 c	44.82 c	17.33 bc	81.56 c	18.38 c	139.16 cd	40.95 c	-	-
5	Chleb D	4.41 abc	1.28 bc	41.92 d	18.10 b	82.10 c	21.00 b	136.00 d	44.11 b	-	-
6	Chleb E	4.13 c	1.15 c	41.73 d	16.32 d	82.89 c	18.83 c	134.92 d	38.63 d	-	-
	Śr. Kw. Odch.	0.7	0.3	133.7	23.5	311.7	35.6	1099.0	154.2	-	-
	Statystyka F	7**	10**	35**	50**	30**	33**	43**	80**	-	-
Frakcja fenoli związanych z arabinoksylianami frakcji rozpuszczalnej											
1	Mąka	2.95 a	1.29 c	65.07 c	25.64 b	24.88 d	26.53 c	104.21 c	60.62 c	95.97 d	152.60 a
2	Chleb A	0.21 d	1.64 b	69.48 bc	24.19 c	79.42 a	53.56 a	152.39 a	96.79 a	182.96 b	142.05 a
3	Chleb B	0.33 d	1.44 bc	82.81 a	31.85 a	55.21 b	35.76 b	145.97 a	80.08 b	285.40 a	106.87 b
4	Chleb C	0.95 b	1.91 a	70.32 bc	25.62 b	39.36 c	28.73 bc	118.29 b	69.87 c	185.89 b	102.10 b
5	Chleb D	0.43 cd	1.36 c	75.01 ab	25.84 b	39.35 c	27.40 bc	117.62 b	67.54 c	142.27 c	99.18 b
6	Chleb E	0.67 c	0.90 d	72.23 bc	24.84 bc	45.82 c	30.11 bc	124.09 b	65.00 c	150.79 c	109.97 b
	Śr. Kw. Odch.	14.8	1.6	508.7	107.6	4831.0	1476.6	4749.0	2442.1	56748.0	7189.0
	Statystyka F	252**	40**	8**	125**	126**	23**	73**	33**	267**	61**
Odmiana											
Frakcja fenoli wolnych											
1	Amilo	1.90 c	0.95 ab	22.31 e	8.47 d	7.36 e	1.96 b	42.13 c	15.00 c	-	-
2	Diament	2.06 bc	0.89 b	27.61 b	11.69 a	9.04 c	2.93 a	50.20 b	19.49 a	-	-
3	Horyzo	2.60 a	0.87 b	32.24 a	9.93 c	13.84 a	2.67 a	62.45 a	16.86 b	-	-
4	Kier	2.11 b	1.04 a	23.24 d	9.55 c	7.74 d	1.83 b	43.87 c	16.52 b	-	-
5	Stanko	2.19 b	0.42 c	26.49 c	10.90 b	10.24 b	1.93 b	50.18 b	16.50 b	-	-
	Śr. Kw. Odch.	0.7	0.6	155.8	15.4	67.9	2.5	635.9	26.5	-	-
	Statystyka F	32**	56**	399**	185**	141**	21**	318**	75**	-	-
Frakcja fenoli skoniugowanych											
1	Amilo	5.54 d	1.75 d	62.43 c	21.55 e	94.69 b	16.16 c	178.89 c	44.89 d	-	-
2	Diament	6.34 c	2.07 c	71.65 b	31.39 a	96.95 b	24.39 a	195.43 b	65.59 a	-	-
3	Horyzo	7.39 a	2.18 bc	85.60 a	28.06 c	115.49 a	22.90 b	231.70 a	60.45 b	-	-
4	Kier	6.81 b	2.35 ab	64.07 c	26.02 d	74.90 c	22.61 b	164.35 d	58.49 c	-	-
5	Stanko	7.04 ab	2.41 a	72.65 b	30.61 b	97.20 b	22.84 b	195.45 b	63.95 a	-	-
	Śr. Kw. Odch.	5.3	0.7	843.2	156.7	2072.3	103.7	6323.0	672.0	-	-
	Statystyka F	59**	29**	255**	500**	281**	105**	346**	342**	-	-
Frakcja fenoli związanych z arabinoksylianami frakcji rozpuszczalnej											
1	Amilo	1.64 a	1.98 b	72.72 ab	25.89 b	48.21 c	35.78 b	138.47 b	78.76 b	169.45 b	131.30 a
2	Diament	0.60 c	1.66 c	68.57 b	23.89 c	60.15 b	49.36 a	135.23 b	93.97 a	141.12 c	141.71 a
3	Horyzo	1.08 b	2.63 a	81.70 a	27.35 a	74.71 a	54.07 a	161.45 a	98.78 a	405.83 a	101.93 b
4	Kier	0.30 cd	1.23 d	71.66 ab	25.72 b	46.39 c	25.58 c	120.60 c	60.60 c	186.29 b	137.87 a
5	Stanko	0.00 d	0.00 e	70.66 ab	27.75 a	43.93 c	24.86 c	122.50 c	72.03 b	79.92 d	107.17 b
	Śr. Kw. Odch.	4.2	9.6	256.6	23.4	1642.6	1798.4	2683.1	2464.3	153284.0	3323.9
	Statystyka F	46**	249**	3*	26**	40**	55**	41**	75**	521**	26**
Odmiana × Technologia											
Frakcja fenoli wolnych											
	Śr. Kw. Odch.	0.3	0.5	14.7	3.0	6.7	0.7	41.7	8.4	-	-
	Statystyka F	13**	46**	38**	36**	14**	56**	21**	24**	-	-
Frakcja fenoli skoniugowanych											
	Śr. Kw. Odch.	0.35	0.06	49.90	5.98	97.80	3.37	273.00	19.20	-	-
	Statystyka F	4**	3*	15**	19**	13**	3**	15**	10**	-	-
Frakcja fenoli związanych z arabinoksylianami frakcji rozpuszczalnej											
	Śr. Kw. Odch.	3.1	3.4	69.7	2.9	164.1	125.3	350.7	201.8	17178.0	2889.4
	Statystyka F	34**	90**	1	3**	4**	4**	5**	6**	58**	23**

^a – suma zawartości kwasów: p-hydroksybenzoesowego, wanilinowego, kawowego, syringowego, p-kumarowego, ferulowego i synapowego.

Tabela 4.2.1.

Parametry aktywności antyoksydacyjnej mąk wyjściowych i układów modelowych chleba.

L.p.		PR _{FC}				Act _{ABTS+*}				Act _{DPPH*}		Act _{SOD-t}	
		Metanol		Bufor PBS		Metanol		Bufor PBS		C	W	C	W
		C	W	C	W	C	W	C	W				
Technologia													
1	Mąka	0.88 b	0.45 d	1.32 a	0.86 a	9.72 a	3.63 a	17.17 a	12.14 a	2.93 bc	1.21 e	4.19 a	4.20 a
2	Chleb A	0.88 b	0.46 cd	1.04 c	0.56 e	8.03 bc	3.08 ab	14.90 c	8.20 b	3.16 a	1.30 d	3.61 b	3.52 b
3	Chleb B	1.06 a	0.56 a	1.17 b	0.68 b	7.25 c	2.79 b	17.15 a	10.84 a	2.96 b	1.35 cd	3.59 b	3.46 b
4	Chleb C	0.92 b	0.48 c	1.05 c	0.57 de	8.16 b	3.20 ab	15.04 c	8.29 b	3.10 a	1.40 bc	3.58 b	3.50 b
5	Chleb D	0.91 b	0.51 b	1.04 c	0.59 c	8.03 bc	3.33 ab	14.92 c	8.74 b	2.96 b	1.48 a	3.59 b	3.49 b
6	Chleb E	0.92 b	0.47 c	1.06 c	0.58 d	7.69 bc	3.24 ab	15.63 b	8.78 b	2.85 c	1.43 ab	3.57 b	3.51 b
	Śr.Kw.Odch.	0.1	0.0	0.2	0.2	10.6	1.3	20.2	34.2	0.2	0.1	0.7	1.0
	Statystyka F	128**	61**	171**	1157**	824**	364**	539**	1078**	28**	55**	298**	232**
Odmiana													
1	Amilo	0.85 d	0.38 d	1.19 b	0.58 b	6.91 e	2.96 b	14.18 d	7.70 c	2.75 cd	1.22 d	3.60ab	3.43 c
2	Diament	1.06 a	0.63 a	1.10 d	0.58 b	8.07 bc	2.73 d	16.77 ab	8.34 c	3.16 b	1.44 b	3.65 a	3.55 ab
3	Horyzo	1.00 b	0.47 bc	1.14 c	0.56 bc	8.75 a	3.10 b	16.24 ab	7.94 c	3.59 a	1.56 a	3.63 ab	3.46 bc
4	Armand	0.95 c	0.41 cd	1.00 f	0.49 c	7.59 cd	2.72 b	13.85 d	8.33 c	3.09 b	1.42 b	-	-
5	Kier	0.82 e	0.53 b	1.14 c	0.61 b	7.42 de	4.49 a	15.77 bc	11.72 a	2.93 bc	1.37 bc	3.58 b	3.48 bc
6	Agat	0.85 d	0.52 b	1.04 e	0.62 b	7.43 de	2.88 b	14.78 cd	8.78 bc	2.60 d	1.32 c	3.65 a	3.62 a
7	Stanko	1.05 a	0.53 b	1.22 a	0.73 a	8.64 ab	3.09 b	17.37 a	9.98 b	2.89 bcd	1.43 b	3.42 c	3.44 c
	Śr.Kw.Odch.	0.1	0.1	0.1	0.1	4.3	4.6	21.0	35.1	1.0	0.1	0.1	0.1
	Statystyka F	233**	178**	640**	742**	461**	1165**	533**	2735**	156**	43**	26**	12**
Odmiana × Technologia													
	Śr.Kw.Odch.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.4	0.6	0.1	0.1	0.0	0.0
	Statystyka F	13**	11**	33**	32**	17**	55**	10**	43**	14**	19**	1	1

PR_{FC} – potencjał redukcyjny (mg GAE·g⁻¹ s.m.); Act_{ABTS+*} – zdolność neutralizacji rodników ABTS* (μmol TE·g⁻¹ s.m.); Act_{DPPH*} – zdolność neutralizacji rodników DPPH* (μmol TE·g⁻¹ s.m.); Act_{SOD-t} – zdolność neutralizacji rodników ponadtlenkowych (EU·g⁻¹ s.m.).

Tabela 4.3.1.

Wartości lepkości ekstraktu maleinowego (MEV), pH ekstraktu wodnego oraz arabinoksylianów frakcji rozpuszczalnej (AX) i ich parametrów w mączkach wyjściowych i układach modelowych chleba.

L.p.		MEV	pH	AX	Ara/Xyl	% Ext	Fer/Xyl	DiFer/Xyl
Frakcja rozpuszczalna – całościarnowe								
1	Mąka	19.24 e	6.62 a	2.42 e	0.590 a	29.30 d	2.9 ab	2.1 d
2	Chleb A	27.61 d	6.15 d	2.83 b	0.569 c	33.97 bc	2.6 cd	3.4 b
3	Chleb B	30.04 c	4.66 f	2.88 a	0.563 d	34.99 a	3.1 a	5.2 a
4	Chleb C	29.00 c	6.19 b	2.79 cd	0.573 b	34.23 c	2.6 d	3.6 b
5	Chleb D	32.44 b	6.16 c	2.78 d	0.574 b	34.61 ab	2.9 abc	2.8 c
6	Chleb E	33.81 a	5.62 e	2.81 bc	0.568 c	34.97 a	2.7 bcd	2.9 c
	Śr. Kw. Odch.	371.66	6.60	0.39	0.00	66.74	0.46	15.92
	Statystyka F	269.5**	142131**	505.9**	110.0**	313.1**	8.2**	191.6**
Frakcja rozpuszczalna – wymiałowe								
1	Mąka	35.84 d	6.49 a	2.33 d	0.598 b	61.38 d	1.2 b	3.6 a
2	Chleb A	60.70 c	6.00 c	2.52 b	0.602 ab	67.66 b	1.1 e	3.1 b
3	Chleb B	81.29 a	4.00 e	2.67 a	0.602 ab	71.96 a	1.3 a	2.2 c
4	Chleb C	71.95 b	6.03 b	2.50 bc	0.603 a	67.57 bc	1.1 cd	2.3 c
5	Chleb D	72.16 b	6.00 c	2.48 c	0.600 ab	67.05 c	1.1 c	2.2 c
6	Chleb E	78.76 a	5.78 d	2.49 bc	0.598 b	67.33 bc	1.1 de	2.4 c
	Śr. Kw. Odch.	15115.70	10.70	0.16	0.00	159.2	0.11	4.98
	Statystyka F	2298.5**	191163**	204.5**	4.0**	644.0**	59.7**	86.4**
Odmiana								
Frakcja rozpuszczalna – całościarnowe								
1	Amilo	58.29 a	5.77 b	3.02 a	0.588 a	36.19 a	2.6 cd	3.0 d
2	Diament	31.85 b	5.75 c	2.92 b	0.580 b	35.53 b	2.5 d	2.6 e
3	Horyzo	28.29 c	5.82 a	2.82 c	0.561 e	34.39 c	2.9 b	7.6 a
4	Armand	28.03 c	5.81 a	2.84 c	0.568 c	34.50 c	2.6 cd	2.4 e
5	Kier	20.17 d	5.71 e	2.70 e	0.562 de	34.15 c	2.8 bc	3.7 c
6	Agat	26.72 c	5.72 d	2.76 d	0.565 cd	33.94 c	3.2 a	4.2 b
7	Stanko	20.71 d	5.71 e	2.65 f	0.562 de	33.17 d	2.8 bc	1.6 f
	Śr. Kw. Odch.	1669.81	0.02	0.16	0.00	10.19	0.55	39.25
	Statystyka F	1174.0**	412.0**	211.8**	155.0**	46.6**	16.4**	448.3**
Frakcja rozpuszczalna – wymiałowe								
1	Amilo	154.11 a	5.58 b	2.65 a	0.618 a	71.97 a	1.1 d	2.7 bc
2	Diament	74.73 b	5.61 a	2.67 a	0.608 b	68.04 c	1.0 e	2.9 ab
3	Horyzo	73.70 b	5.60 a	2.53 b	0.597 cd	68.85 b	1.2 b	2.2 d
4	Armand	74.64 b	5.58 b	2.55 b	0.600 c	69.09 b	1.1 cd	1.7 e
5	Kier	43.13 d	5.53 d	2.42 d	0.596 d	66.69 d	1.2 bc	3.1 a
6	Agat	50.32 c	5.48 e	2.49 c	0.597 cd	67.44 c	1.2 a	1.8 e
7	Stanko	40.17 d	5.55 c	2.41 d	0.594 d	66.12 d	1.2 a	2.4 cd
	Śr. Kw. Odch.	15115.70	0.02	0.10	0.00	37.6	0.09	2.78
	Statystyka F	2298.5**	297.0**	120.1**	111.0**	167.0**	54.9**	54.2**
Odmiana × Technologia								
Frakcja rozpuszczalna – całościarnowe								
	Śr. Kw. Odch.	26.81	0.02	0.00	0.00	2.15	0.07	5.08
	Statystyka F	18.9**	314.0**	1.2	2.0*	9.8**	2.1*	58.0**
Frakcja rozpuszczalna – wymiałowe								
	Śr. Kw. Odch.	248.80	0.02	0.00	0.00	1.4	0.00	1.45
	Statystyka F	37.8**	257.0**	3.0**	2.0*	6.0**	2.3**	28.2**

Ara/Xyl – stopień arabinozylacji; % Ext – stopień ekstraktywności; Fer/Xyl – stopień ferulacji; DiFer/Xyl – stopień usieciowania. Współczynniki Fer/Xyl i DiFer/Xyl wyrażono jako 10⁻³.

Niniejsze badania wykazały, że lepkość ekstraktów ziarna żyta i jego produktów była ściśle powiązana nie tylko z zawartością rozpuszczalnej części arabinoksylianów w ekstrakcie ale także poziomem masy cząsteczkowej tych polisacharydów i oddziaływań międzycząsteczkowych. Przedstawione w rozprawie badania wykazały istnienie procesów modyfikacji struktury poszczególnych subfrakcji arabinoksylianowych frakcji rozpuszczalnej tych biopolimerów przez działanie enzymów występujących w mące oraz dostarczanych przez drożdże i bakterie kwasu mlekowego a także zwiększenie kwasowości ciasta, w wyniku czego wywołane zostały procesy hydrolityczne. Zmiany te dotyczyły wzrostu mas cząsteczkowych arabinoksylianów wysokocząsteczkowych (AX-HMM) oraz zmniejszeniu ich promieni: żyracji i hydrodynamicznego a także kształtu, jaki te molekuly przybierały w roztworze. Wydaje się być to związane ze zmianą aktywności enzymatycznej enzymów endogennych z grupy endoksylianaz, które hydrolizowały część wiązań w cząsteczkach polimerów nieskrobiowych tym samym uwalniając część arabinoksylianów frakcji nierozpuszczalnej oraz ułatwiając dostęp esterazy ferulanowej do wiązań estrowych.

Wydłużanie czasu fermentacji żurku skutkowało bardzo intensywną degradacją populacji wysokocząsteczkowej arabinoksylianów frakcji AX-III o wysokim współczynniku Ara/Xyl, szczególnie w odniesieniu do analogów z chleba całościarnowego. Analiza współczynników korelacji wykazała, że populacja arabinoksylianów AX-I o niskim współczynniku Ara/Xyl miała decydujący wpływ na wartość lepkości ekstraktów chleba całościarnowego, podczas gdy w ekstraktach chleba wymiałowego na wartość tego parametru duży wpływ miała subfrakcja arabinoksylianów AX-II o pośrednim współczynniku Ara/Xyl.

Metoda E przygotowania ciasta żytniego stanowiła najkorzystniejszy sposób osiągnięcia wysokiej lepkości ekstraktu chleba całościarnowego, pomimo faktu, że to metoda B skutkowała maksymalną ilością rozpuszczalnych arabinoksylianów o najwyższym stopniu ferulacji i usieciowania tych makromolekuł, co zaobserwowano w przypadku ekstraktu chleba wymiałowego. Na uwagę zasługuje również najniższy współczynnik Ara/Xyl arabinoksylianów rozpuszczalnych obecnych w chlebie B oraz statystycznie istotny związek tego parametru ze zdolnością neutralizacji kationorodnika ABTS*^{*} jego ekstraktów buforowych. Odmiana żyta Amilo wykazywała największy potencjał podnoszenia lepkości na tle innych odmian żyta, a także zapewniała maksymalną koncentrację i ekstraktywność arabinoksylianów frakcji rozpuszczalnej błonnika pokarmowego w chlebie.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy pozwoliły na prześledzenie łańcucha zależności warunkującej poziom lepkości ekstraktów maleinowych chleba. Zaobserwowano, że wskaźnik hydrolizy ΔAX_{nr} uzależniony był od aktywności endo- β -D-ksylanazy oraz esterazy ferulanowej, które wpływały na zawartość rozpuszczalnej frakcji arabinoksylianów w chlebie, co pokazały statystycznie istotne korelacje występujące między tymi parametrami.

Wzrost wartości lepkości ekstraktów chleba w porównaniu z ekstraktami mąki świadczył o wystąpieniu procesów hydrolitycznych w trakcie przygotowania ciasta chlebowego wskutek czego zwiększył się udział frakcji rozpuszczalnej arabinoksylianów. Zmianie uległ również wzajemny stosunek poszczególnych subfrakcji arabinoksylianów o wysokich masach cząsteczkowych. Metody fermentacyjne powodowały zmniejszenie współczynnika Ara/Xyl każdej subfrakcji arabinoksylianowej w stosunku do mąk, jak również obniżenie mas cząsteczkowych arabinoksylianów poprzez hydrolityczne działanie enzymów z grupy ksylianaz i arabinofuranozydaz a stopień tych zmian uzależniony był od aktywności enzymatycznej mąki. Zwiększenie stopnia usieciowania każdej subfrakcji sugerowała obecność arabinoksylianów, które uwolnione z frakcji nierozpuszczalnej na drodze hydrolizy zasiliły pulę frakcji rozpuszczalnej. Natomiast niejednoznaczne zmiany stopnia ferulacji poszczególnych subfrakcji mogły świadczyć o zróżnicowanej kinetyce reakcji hydrolizy w zależności od odmiany mąki, jak i od stopnia jej wymiału.

5. PODSUMOWANIE

Prowadzone badania wykazały występowanie różnic w dominujących mechanizmach modyfikacji struktury łańcuchów żytnich arabinoksylianów rozpuszczalnych oraz warunki, w jakich one występowały. Ukazywały również kompleksowość działania antoksydacyjnego i jego zależność od ilości substancji fenolowych. Nie mniej ważnym aspektem było wykazanie istnienia odmian żyta łączących obydwie czynniki prozdrowotne; zaobserwowano występowanie takich odmian, w których była wyraźna przewaga jednego z badanych czynników.

Wyniki niniejszych badań wykazały, że na biodostępność związków fenolowych, potencjał antyoksydacyjny oraz potencjał wzrostu lepkości ekstraktu wpływał poziom kwasowości ciasta. Obniżenie pH ciasta skutkowało przewagą udziału hydrolizy kwasowej nad enzymatyczną w procesie uwalniania substancji fenolowych, mających wpływ na potencjał antyoksydacyjny ekstraktu chleba. Sprzyjało także zwiększeniu zawartości arabinoksylianów frakcji rozpuszczalnej kosztem frakcji nierozpuszczalnej tych biopolimerów, co wpływało na potencjał wzrostu lepkości ekstraktu.

Biodostępność związków fenolowych związanych ze ścianą komórkową, w większości przypadków zwiększała się pod wpływem procesów zachodzących podczas otrzymywania ciasta. Związane było to głównie z synergicznym działaniem esterazy ferulanowej z innymi endogennymi enzymami, jak również czynnikami dodanymi lub wytworzonymi podczas fermentacji zakwasu, powodującymi częściową degradację głównych składników ciasta. Duże znaczenie w biodostępności kwasów fenolowych miał dobór odpowiedniej odmiany żyta w stosunku do zastosowanej metodologii przygotowania ciasta chlebowego. Wykazano istnienie odmian, dla których preferowane były metody bezpośrednie, bez wcześniejszego fermentowania zakwasu (Amilo), oraz takich, które wymagały dodatku natywnego startera, w zależności od potrzeb fermentowanego w czasie 12 godzin (Diament, Kier) lub dłużej (Stanko). Wreszcie stwierdzono istnienie odmian, które niezależnie od metody przygotowania ciasta zwiększały ilość biodostępnych związków fenolowych, zarówno kwasów fenolowych jak i dehydrodimerów kwasu ferulowego w otrzymanym chlebie (Horyzo).

Potencjał antyoksydacyjny chleba żytniego uwarunkowany był w dużej mierze polarnymi substancjami, o wysokiej zdolności neutralizacji wolnych rodników. Spośród pięciu różnych metod przygotowania ciasta żytniego do wypieku tylko metoda bezpośrednia z dodatkiem kwasu mlekowego pozwoliła na maksymalną biodostępność związków o charakterze antyoksydacyjnym zawartych w całościarnym chlebie żytnim. Obserwacje te świadczą o znaczeniu zwiększonej kwasowości ciasta żytniego w kierunku zwiększenia biodostępności związków fenolowych o właściwościach antyoksydacyjnych, w szczególności tych o bardziej polarnym charakterze. Wykazano istnienie możliwości zmaksymalizowania właściwości przeciwutleniających chleba żytniego poprzez wybór odpowiedniej metodologii przygotowania i wypieku chleba co potwierdza ważność doboru technologii do osiągnięcia optymalnego potencjału antyoksydacyjnego chleba.

Na zdolność chleba żytniego do neutralizacji rodników, określoną testami przesiewowymi z użyciem syntetycznych rodników ABTS⁺ i DPPH^{*}, a także na stężenie związków o potencjale redukcyjnym, oznaczonych przy pomocy odczynnika Folin-Ciocalteu, wpływał zarówno genotyp, jak i metoda produkcji chleba. Natomiast zdolność do ograniczania toksyczności anionowych rodników ponadtlenkowych, była kontrolowana wyłącznie przez genotyp żyta, o czym świadczy test SOD. Udowodniono występowanie unikatowych genotypów żyta, mających szczególne znaczenie dla produkcji chleba o maksymalnym potencjale antyoksydacyjnym.

Na potencjał wzrostu lepkości ekstraktu chleba, zależny od zawartości i struktury makromolekularnej arabinoksylianów rozpuszczalnych, istotny wpływ miał zarówno dobór odmiany żyta gwarantujący uzyskanie maksymalnej zawartości rozpuszczalnych arabinoksylianów o wysokich masach cząsteczkowych i wysokim stopniu usieciowania, jak i zastosowanie odpowiedniej technologii przygotowania ciasta. Warunki te spełniała metoda bezpośrednia z dodatkiem kwasu mlekowego (B) oraz trójfazowa z najdłuższym czasem fermentacji startera natywnego (E). Wyższa masa molekularna arabinoksylianów rozpuszczalnych mąk wymiałowych w porównaniu z mąkami całościarnymi istotnie podnosiła lepkość ekstraktu chleba uzyskanego z mąk wymiałowych. Wynika z tego, że struktura arabinoksylianów może być modyfikowana odpowiednim doбором technologii przygotowania ciasta do wypieku.

Podsumowując, w ramach niniejszych badań wykazano wpływ ilościowo-jakościowy arabinoksylianów frakcji rozpuszczalnej na potencjał wzrostu lepkości ekstraktu chleba żytniego. Wyjaśniono niektóre mechanizmy biodostępności kwasów fenolowych oraz dehydrodimerów kwasu ferulowego, czyli niebiałkowych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych. Bardzo ważnym osiągnięciem było udokumentowanie znaczenia stopnia podstawienia łańcuchów arabinoksylianów kwasami fenolowymi oraz dehydrodimerami kwasu ferulowego dla potencjału antyoksydacyjnego chleba żytniego.

6. WNIOSKI

W wyniku prowadzonych badań, będących podstawą niniejszej rozprawy, sformułowano następujące wnioski:

1. Zastosowanie odpowiedniej procedury przygotowania ciasta z mąki żytniej może istotnie zwiększyć potencjał podnoszenia lepkości chleba oraz biodostępność substancji fenolowych, co w konsekwencji wpływa na wzrost potencjału prozdrowotnego;
2. Metoda bezpośrednia przygotowania ciasta żytniego z dodatkiem kwasu mlekowego (metoda B) jest ekonomicznie efektywniejsza niż metoda trójfazowa z najdłuższym czasem fermentacji startera (metoda E), gdyż przygotowanie ciasta trwa mniej niż 5 godzin w porównaniu do ponad 48 godzin potrzebnych w metodzie trójfazowej. Obydwie metody pozwalają uzyskać chleby całościarnowe o wysokiej lepkości ekstraktu i wysokiej koncentracji arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą, lecz tylko metoda B istotnie wpływa na kwasowość chleba i wysoką koncentrację biodostępnych fenoli;
3. Związki fenolowe związane estrowo z arabinoksylianami ekstrahowalnymi wodą oraz upłynnianymi w procesach hydrolizy enzymatycznej / kwasowej, lecz nie te w formie wolnej i skoniugowanej (ekstrahowalne etanolem), determinują potencjał redukcyjny chleba oraz jego zdolność do neutralizacji kationorodnika ABTS⁺. Stopień arabinozylacji tych polisacharydów również ma istotny wpływ na aktywność antyrodnikową (ABTS⁺) chleba a ich koncentracja i stopień usieciowania na zdolność do neutralizacji rodnika ponadtlenkowego O₂^{*};
4. Kwasy fenolowe i dehydrodimery kwasu ferulowego związane estrowo z arabinoksylianami stanowią dominującą grupę fenoli biodostępnych we frakcjach wodnych chleba żytniego;
5. Stopień ferulacji i usieciowania arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą, lecz nie zawartość tego polisacharydu, determinuje koncentrację fenoli biodostępnych w chlebie;
6. Wyższy stopień ferulacji i usieciowania arabinoksylianów chleba całościarnowego w porównaniu do wymiałowego jest jednym z głównych czynników wpływających na wyższą aktywność antyoksydacyjną chleba całościarnowego;
7. Koncentracja i masa cząsteczkowa arabinoksylianów upłynnianych w wyniku hydrolizy kwasowej bądź enzymatycznej z frakcji nierozpuszczalnej istotnie wpływa na potencjał lepki chleba. Niższa masa cząsteczkowa dominującej populacji arabinoksylianów wysokocząsteczkowych (AX-I) ekstrahowalnych wodą w chlebie całościarnowym jest głównym czynnikiem warunkującym niższy potencjał lepki tego chleba w porównaniu do potencjału lepkiego chleba wymiałowego;
8. Wysoki stopień ferulacji arabinoksylianów ekstrahowalnych wodą i upłynnianych w wyniku hydrolizy kwasowej / enzymatycznej pozytywnie wpływa na zachowanie ich masy cząsteczkowej. Natomiast wysoki stopień arabinozylacji tych polisacharydów determinuje podatność łańcucha głównego na degradację (redukcję masy cząsteczkowej). W konsekwencji niski stopień arabinozylacji i jednocześnie wysoki stopień ferulacji dominującej populacji wysokocząsteczkowych arabinoksylianów AX-I warunkują odporność na degradację łańcuchów głównych podczas przygotowania ciasta do wypieku a przez to wysoki potencjał podnoszenia lepkości chleba;
9. Kwasowość ciasta żytniego pozytywnie wpływa na stopień hydrolizy arabinoksylianów nierozpuszczalnych oraz stopień ich upłynnienia, który warunkuje koncentrację arabinoksylianów w chlebie;
10. Odmiany żyta różnią się koncentracją biodostępnych antyoksydantów fenolowych, co powoduje występowanie różnic w potencjale antyoksydacyjnym chleba (w zrealizowanym doświadczeniu najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym charakteryzowały się chleby otrzymane z mąki całościarnowej odmiany **Stanko**);

11. Odmiany żyta różnią się zarówno masą cząsteczkową arabinoksylianów rozpuszczalnych, jak i koncentracją dominującej, wysokocząsteczkowej subfrakcji AX-I, co powoduje występowanie różnic w potencjale podnoszenia lepkości chleba (w zrealizowanym doświadczeniu najwyższym potencjałem podnoszenia lepkości charakteryzowały się chleby otrzymane z mąki wymiałowej odmiany **Amilo**);
12. Implementacja do szerokiej praktyki piekarniczej metody bezpośredniej przygotowania ciasta żytniego z dodatkiem kwasu mlekowego, pozytywnie wpływającej na potencjał redukcyjny i podnoszenia lepkości chleba, może stanowić element metod zapobiegania chorobom cywilizacyjnym poprzez podnoszenie potencjału prozdrowotnego chleba żytniego.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Bonikowski, R., Paoli, M., Szymczak, K., Krajewska, A., Wajs-Bonikowska, A., Tomi, F., Kalemba, D. (2016) Chromatographic and spectra characteristic of some esters of a common monoterpene alcohols. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(4), 290-292.
2. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
3. Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H. (2005). Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Letters*, 46(35), 5845-5850.
4. Cleemput, G., Bleukx, W., van Oort, M., Hessing, M., Delcour, J.A. (1995). Evidence for the presence of arabinoxylan hydrolysing enzymes in European wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 22(2), 139-145.
5. Cummings, J.H. (1984). Constipation, dietary fibre and the control of large bowel function. *Postgraduate Medical Journal*, 60(11), 811-819.
6. Cyran, M.R., Ceglińska, A., Kolasińska, I. (2012). Depolymerization degree of water-extractable arabinoxylans in rye bread: characteristics of inbred lines used for breeding of bread cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8720-8730.
7. Cyran, M.R., Saulnier, L. (2012). Macromolecular structure of water-extractable arabinoxylans in endosperm and wholemeal rye breads as factor controlling their extract viscosities. *Food Chemistry*, 131(2), 667-676.
8. De Vuyst, L., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1-3), 43-56.
9. Donaghy, J.A., Kelly, P.F., McKay, A. (1999). Conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by yeasts isolated from unpasteurized apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 453-456.
10. Englyst, H.N., Quigley, M.E., Hudson, G.J. (1994). Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *The Analyst*, 119(7), 1497-1509.
11. Fazary, A.E., Ju, Y.-H. (2007). Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(11), 811-828.
12. Gänzle, M.G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37(1), 2-10.
13. Gobbetti, M. (1998). The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science and Technology*, 9(7), 267-274.
14. Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, J., Seiter, M.F.H., Vogelmann, S.A. (2006). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1), 4-11.
15. Hansen, H.B., Andreasen, M.F., Nielsen, M.M., Larsen, L.M., Bach Knudsen, K.E., Meyer, A.S., Christensen, L.P., Hansen, A. (2002) Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread-making. *European Food Research and Technology*, 214(1), 33-42.
16. Hansen, H.B., Rasmussen, C.V., Knudsen, K.E.B., Hansen, Å. (2003). Effects of genotype and harvest year on content and composition of dietary fibre in rye (*Secale cereale* L.) grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(1), 76-85.
17. Hilhorst, R., Dunnewind, B., Orsel, R., Stegeman, P., van Vliet, T., Gruppen, H., Schols, H.A. (1999). Baking performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. *Food Chemistry and Toxicology*, 64(5), 808-813.
18. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
19. Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 33-48.
20. Jenkins, D.J.A., Marchie, A., Augustin, L.S.A., Ros, E., Kendall, C.W.C. (2004). Viscous dietary fibre and metabolic effects. *Clinical Nutrition Supplements*, 1(2), 39-49.
21. Li, D., Park, J., Oh, J.-R. (2001). Silyl derivatization of alkylphenols, chlorophenols, and bisphenol A for simultaneous GC/MS determination. *Analytical Chemistry*, 73(13), 3089-3095.
22. Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2006). Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1256-1264.

23. Malunga, L.N., Beta, T. (2015). Antioxidant capacity of arabinoxylan oligosaccharide fractions prepared from wheat aleurone using *Trichoderma viride* or *Neocallimastix patriciarum* xylanase. *Food Chemistry*, 167, 311–319.
24. Malunga, L.N., Izydorczyk, M., Beta, T. (2017). Effect of water-extractable arabinoxylans from wheat aleurone and bran on lipid peroxidation and factors influencing their antioxidant capacity. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 10(1), 20-26.
25. Michalska, A., Zieliński, H. (2006). Effect of flour extraction rate on bioactive compounds content of two rye varieties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15/56(3), 297–303.
26. Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523-530.
27. Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E., Berset, C. (2003). Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(10), 1007-1012.
28. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
29. Rasmussen, C.V., Hansen, H.B., Hansen, Å., Larsen, L.M. (2001). pH-, temperature- and time-dependent activities of endogenous endo- β -D-xylanase, β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase in extracts from ungerminated rye (*Secale cereale* L.) grain. *Journal of Cereal Science*, 34(1), 49-60.
30. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
31. Rodríguez, H., Landete, J.M., de las Rivas, B., Muñoz, R. (2008). Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T. *Food Chemistry*, 107(4), 1393-1398.
32. Roehring, K.L. (1998). The physiological effects of dietary fiber – a review. *Food Hydrocolloids*, 2(1), 1-18.
33. Rybka, K., Sitariski, J., Raczyńska-Bojanowska, K. (1993). Ferulic acid in rye and wheat grain and Grain dietary fiber. *Cereal Chemistry*, 70(1), 55–59.
34. Scott, R.W. (1979) Colorimetric determination of hexuronic acids in plant material. *Analytical Chemistry*, 51(7), 936-941.