

dr hab. Urszula Złotek, prof. uczelni  
Katedra Biochemii i Chemii Żywności  
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 6.07.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Dagmary Poniewskiej  
pt. „Enzymatycznie wspomaganą ekstrakcją bioaktywnych inozytoli z nasion  
gryki i jej możliwe zastosowania”**

Ocenę pracy doktorskiej wykonałam na zlecenie Przewodniczącego Rady Dyscypliny Technologii Żywności i Żywienia, dr hab. Marcina Łukasiewicza, prof. URK, zgodnie z wymogami Ministra Edukacji i Nauki na podstawie art.14 ust.1 pkt. 1 oraz ust. 2 pkt. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o – o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2014 r., poz. 1852 z późn. zm.) , w zw. z art. 179 ust. 2 oraz ust. 3 pkt. 2 lit. b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz uchwały Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie z dnia 17 maja 2023 roku.

### **Ocena wartości naukowej rozprawy:**

Gryka – roślina dwuliścienna z rodziny rdestowatych zaliczana do pseudozboź w ostatnich latach zyskuje na popularności wśród producentów żywności oraz konsumentów z uwagi na wzrost wiedzy na temat wartości odżywczej oraz zawartości składników bioaktywnych w tej roślinie. Należy również zauważyć, że Polska jest jednym z czołowych producentów tego pseudozboża. Ziarniaki gryki są bardzo dobrym źródłem składników odżywczych wśród których na szczególną uwagę zasługuje białko ze względu na bardzo korzystny skład aminokwasowy oraz brak glutenu. Ponadto bogactwo składników mineralnych, witamin oraz innych związków bioaktywnych tj. związki fenolowe oraz inozytoli sprawiają, że surowiec ten może być brany pod uwagę przy poszukiwaniu nowych produktów przemysłu spożywczego, szczególnie w kontekście wytwarzania żywności funkcjonalnej. **W trend ten doskonale wpisuje się przedstawiona do recenzji praca mgr inż. Dagmary Poniewskiej dotycząca optymalizacji ekstrakcji inozytoli z nasion gryki oraz możliwości wykorzystania gryki do produkcji nowych produktów funkcjonalnych.**

### **Ocena wartości merytorycznej rozprawy:**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest dość starannie przygotowanym pod względem naukowym i graficznym opracowaniem o układzie typowym dla tego typu prac. Liczy ona 278 stron i podzielona jest na 10 głównych rozdziałów. Dysertacja zawiera łącznie 68 rysunków i 111 tabel, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz aneks.

Pierwszy z rozdziałów to Przegląd literatury wprowadzający czytelnika w tematykę dysertacji poprzedzony krótkim Wstępem. Następnym to Hipotezy badawcze,

kolejne to Cel badań, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja, Dyskusja, Wnioski, Literatura, Spis rysunków i Spis Tabel. Pracę zamykają Streszczenie i Aneks.

Treść pracy oparta jest na obszernej literaturze przedmiotu. Spośród niezwykle obszernego piśmiennictwa Autorka wykorzystała 335 prac, z których większość to prace z ostatnich 10 lat, opublikowane w czasopismach o wysokiej randze naukowej.

**Przegląd literatury** podzielony jest na sześć głównych rozdziałów; każdy z nich składa się z kilku podrozdziałów. Pierwszy dotyczący ogólnej charakterystyki gryki opisuje miejsce tego pseudozboża w polskim rolnictwie oraz ogólną charakterystykę tej rośliny. Następnie w podrozdziale dotyczącym nasion gryki pt. „Wartość odżywcza nasion gryki” przedstawiona jest charakterystyka ich wartości odżywczej i prozdrowotnej. Moim zdaniem w tytule tego podrozdziału należało podkreślić również wartość prozdrowotną nasion gryki ponieważ zawarte w nim są również informacje na temat zawartości związków bioaktywnych i ich właściwości. Kolejny podrozdział poświęcony jest jednej grupie związków bioaktywnych występujących w gryce – inozytolom. Omówiona została budowa tej grupy związków, ich biosynteza, funkcje biologiczne, występowanie w żywności oraz enzymy odpowiedzialne za uwalnianie tych związków z połączeń w jakich występują w tkankach. Kolejne zagadnienia poruszone przez Autorkę to fizyczne i biologiczne procesy wspomagające ekstrakcję związków bioaktywnych z surowców pochodzenia roślinnego. Kolejne podrozdziały charakteryzują proces wytwarzania piwa oraz znaczenie fermentacji mlekowej w przemyśle spożywczym. W mojej opinii ten podrozdział powinien zamknąć Przegląd literatury ponieważ ostatni podrozdział opisujący wysokosprawną chromatografię cieczową moim zdaniem jest zbędny w tym miejscu dysertacji.

Zakres przeglądu literatury (z wyjątkiem ostatniego podrozdziału) oraz dobór treści poszczególnych rozdziałów jest merytorycznie uzasadniony. Stanowi syntetyczne wprowadzenie czytelnika w tematykę oraz bardzo obszerną część eksperymentalną pracy.

W kolejnych dwóch rozdziałach przedstawione są **hipotezy badawcze oraz cel pracy**. W mojej ocenie można było połączyć te dwa rozdziały.

Hipotezy badawcze zostały poprawnie sformułowane. Odnośnie celu pracy - w mojej opinii ta część pracy zyskałaby na przejrzystości, gdyby wyszczególniony został cel główny oraz następnie cele szczegółowe.

Kolejną część pracy stanowią **Materiały i metody**. Rozdział rozpoczyna się od przedstawienia zastosowanego w pracy materiału badawczego oraz zastosowanych preparatów enzymatycznych.

Opis zastosowanych preparatów enzymatycznych jest jednak nieujednolicony – przy niektórych podawana jest aktywność bez optymalnych warunków działania preparatu, przy innych z kolei zamieszczono opis optymalnych warunków działania oraz zalecana dawka – proszę o komentarz.

Następnie zamieszczono opis metod zastosowanych w badaniach poprzedzony schematem obrazującym zakres przeprowadzonych doświadczeń. Jednak lektura tego rozdziału, moim zdaniem, jest dość uciążliwa ze względu na ilość i niejasny podział treści. I tak np. w podrozdziałach 4.2.1 i 4.2.2 zatytułowanych jako oznaczenie ilości inozytoli, odpowiednio całkowitego i wolnego opisana jest jedynie procedura ekstrakcji, a dopiero w podrozdziale 4.2.5 zamieszczono metodę oznaczania tych związków - co moim zdaniem utrudnia czytelnikowi lekturę. Z rozdziału Materiały i metody nie

wynika jasno, że piwo i napój fermentowany był wytwarzany tylko ze słodu laboratoryjnego – dopiero lektura rozdziału dotyczącego opisu wyników wyjaśnia tą kwestię.

Jednakże podkreślić należy, iż duża ilość metod i technik badawczych użytych w badaniach wymagała od Doktorantki niewątpliwie zarówno dużej wiedzy jak i umiejętności praktycznych. Szczególnie cennym narzędziem wykorzystanym przez Doktorantkę jest również analiza statystyczna służąca opracowaniu planu optymalizacji połączenia badanych czynników wspomagających ekstrakcję inozytoli z badanego materiału. Zwłaszcza z uwagi na dużą ilość przebadanych parametrów.

Pewne kwestie wymagają jednak wyjaśnienia i doprecyzowania.

W przypadku preparatów enzymatycznych o aktywnościach fitaz i  $\alpha$ -galaktozydazy przeprowadzono optymalizację warunków działania – czy to oznacza, że producenci nie określili tych parametrów?

Proszę o doprecyzowanie sposobu wyznaczania termostabilności enzymów.

Warunki procesu autoklawowania (a dokładniej ciśnienie w innych jednostkach podane jest w metodyce i w opisie wyników - Tabele 22 i 24).

Czy oznaczając zawartość wybranych metabolitów gryki techniką HPLC tj. fagopiryna i rutyna nie należałoby oznaczyć również poziomu kwercetyny?

Podrozdział 4.2.28 – należy zdefiniować jednostkę EBC stosowaną w oznaczeniach barwy brzezki.

Dlaczego wytwarzając gryczany napój fermentowany fermentację z udziałem bakterii

*Lactobacillus plantarum* przeprowadzano w warunkach tlenowych (rozdział 4.2.39)?

Czy oznaczając zdolność do neutralizowania syntetycznego rodnika DPPH badano kinetykę reakcji? Jeśli nie, na jakiej podstawie dobrano czas reakcji (30 min.)?

Autorka pisze: „Wyniki aktywności antyoksydacyjnej wyrażono jako ekwiwalent  $\mu\text{g}$  troloxu próbki ( $\mu\text{mol TROLOX/g}$ )” – zatem  $\mu\text{g}$  czy  $\mu\text{mol}$ ?

Jak przygotowywano ekstrakty do oznaczenia zawartości związków fenolowych?

Brakuje odniesienia literaturowego w metodzie oznaczania zawartości związków fenolowych.

Jaki wzorzec użyto przy sporządzaniu krzywej wzorcowej w metodzie oznaczania zawartości związków fenolowych?

Kolejny rozdział **Wyniki i dyskusja** należało w mojej ocenie zatytułować Wyniki badań ponieważ Dyskusja wyników jest kolejnym rozdziałem dysertacji.

Niewątpliwie rozdział dotyczący prezentacji wyników badań pokazuje ogrom pracy wykonanej przez Doktorantkę. Z uwagi na ilość zaprezentowanych wyników badań w mojej ocenie tabele zawierające analizy statystyczne można było zamieścić w Aneksie zyskując na przejrzystości. Dodatkowo pewne fragmenty będące elementem dyskusji (np. pierwszy akapit podrozdziału 5.2.1. oraz pierwszy akapit podrozdziału 5.3. należało moim zdaniem przenieść do kolejnego rozdziału). Wyniki badań poszczególnych etapów bardzo obszernych doświadczeń zaprezentowane są w postaci wykresów i tabel. Na podkreślenie zasługuje przeprowadzona pogłębiona analiza statystyczna, pomocna w interpretacji uzyskanych wyników.

W pierwszej części tego obszernego rozdziału zaprezentowano wyniki dotyczące optymalizacji wykorzystania preparatów enzymatycznych w ekstrakcji inozytoli oraz rutyny i fagopiryny z nasion gryki. W następnym etapie badań do enzymatycznie wspomaganey ekstrakcji inozytoli oraz rutyny zostały dodane dodatkowe czynniki (biochemiczne, fizyczne i chemiczne), które również mogły wpływać na wydajność badanej ekstrakcji. Ten etap badań zakończył się opracowaniem planu ekstrakcji badanych związków z wykorzystaniem odpowiedniego modułu oprogramowania statystycznego. Wyniki tego etapu badań zostały wykorzystane w drugiej części pracy do wytwarzania słodu w warunkach laboratoryjnych.

Analizując tą część rozdziału prezentującego wyniki badań nasuwa się kilka pytań i uwag:

Wątpliwości budzi sposób prezentacji wyników na Rysunkach 28 i 30 – proszę o wyjaśnienie dlaczego na osiach odciętych wartości są przedstawione malejąco.

Czy wyniki zaprezentowane w Tabelach 22 i 24 na pewno dotyczą wpływu czasu autoklawowania - proszę o sprostowanie.

Na stronie 90 Autorka pisze „ Nie zauważono statystycznie znaczących różnic w aktywności preparatu w zależności od zastosowanego buforu w optymalnych warunkach pH” – to stwierdzenie nie zgadza się z oznaczeniami dotyczącymi analizy statystycznej zaprezentowanymi na Rysunku 33 – proszę o wyjaśnienie.

Kolejna część rozdziału Wyniki i dyskusja dotyczy badań związanych z wykorzystaniem słodu laboratoryjnego w produkcji piwa i gryczanego napoju fermentowanego. Dokonano analizy składu chemicznego i parametrów decydujących o przydatności technologicznej badanych sładów oraz analizę wytworzonych brzeczek.

Uzyskane wyniki wskazywały na bardzo dobre parametry słoðu laboratoryjnego. Dla porównania został użyty komercyjny sólð gryczany. Wątpliwość budzi wykorzystanie kontrolnego słoðu handlowego tylko do etapu wytwarzania brzeczek gryczanych – czy w kolejnych etapach badań związanych z produkcją piwa i napoju fermentowanego nie należałoby również wykorzystać go jako próbę odniesienia?

Analiza produktów wytworzonych ze słoðu gryczanego (piwo i napój fermentowany) dotyczyły głównie właściwości fizycznych oraz zawartości inozytoli, rutyny, fagopiryny oraz profilu sacharydów.

Ostatnim etapem były badania potencjału antyoksydacyjnego ekstraktów, słoðu oraz wytworzonych produktów. Jednakże zastosowanie w badaniach tylko jednej metody tj. aktywności przeciwrodnikowej wyrażonej jako zdolność do neutralizowania wolnych rodników DPPH budzi wątpliwość jeśli chodzi o wnioskowanie na podstawie otrzymanych wyników. Zdolność do neutralizacji wolnych rodników to tylko jeden z wielu możliwych mechanizmów działania przeciwutleniającego. Należy również zwrócić uwagę na terminologię stosowaną w opisie wyników w tym podrozdziale – błędne metodologicznie jest określenie „siła redukująca DPPH” – w opisywaniu tej aktywności antyoksydacyjnej należy raczej stosować określenia: aktywność przeciwrodnikowa bądź zdolność do neutralizowania wolnych rodników DPPH. Siła redukująca (ang. reducing power) dotyczy innego mechanizmu antyoksydacyjnego związanego ze zdolnością do redukcji jonów żelaza.

Należy podkreślić aspekt praktyczny i ewentualnie aplikacyjny drugiej części badań co stanowi o dodatkowej wartości ocenianej pracy.

Praca jest dość obszerna i opracowanie tak dużej ilości badań wymagało dużego



nakładu pracy i staranności. Jednakże Autorka nie ustrzegła się błędów i uchybień, z których niektóre z obowiązku recenzenta wymienię:

Na rysunkach 29, 35, 38, 64 brakuje analizy statystycznej.

Rysunek 42 – niejasne są oznaczenia dotyczące analizy statystycznej – co oznaczają duże litery, co małe litery i \*?

W Tabelach 105, 106 i 109 brakuje jednostek w jakich wyrażona jest zawartość oznaczanych związków/aktywność

Kolejnym rozdziałem pracy jest **Dyskusja**. W tej części Autorka przeprowadziła szczegółowe porównanie własnych wyników z badaniami przeprowadzonymi przez innych badaczy.

Również do tej części mam kilka pytań i uwag:

Na stronie 184 Autorka pisze „ *W przypadku brzeczek wytwarzanych ze słoju laboratoryjnego odnotowano wzrost stężenia rutyny, natomiast dla brzeczek ze słoju przemysłowego spadek zawartości tej substancji. Spadek ten był wynikiem aktywności enzymów powodujących rozkład rutyny do kwercetyny*” – Jak zatem można wytłumaczyć wzrost stężenia rutyny w brzeczce ze słoju laboratoryjnego? Na jakiej podstawie Autorka wywnioskowała, że spadek zawartości rutyny w przypadku brzeczek ze słoju przemysłowego był wynikiem aktywności enzymów powodujących rozkład rutyny do kwercetyny?

Strona 188 – proszę o wyjaśnienie zdania rozpoczynającego drugi akapit „*W wyniku przeprowadzonej fermentacji stwierdzono istotny wzrost potencjału antyoksydacyjnego*”

*wszystkich wykorzystanych brzeczek w stosunku do srodu i brzezki.”*

Czy w gryczanym napoju fermentowanym liczba bakterii kwasu mlekowego była wystarczająca, aby zaliczyć ten napój do produktów probiotycznych?

Na stronie 191 Autorka pisze „*Brak zmian zawartości fagopiryny w nasionach gryki podczas fermentacji zaobserwowali również w swoich badaniach Złotek i in. (2019), podczas fermentacji kielków nasion roślin strączkowych*” – podczas gdy cytowana praca nie dotyczy ani fermentacji nasion gryki ani badania zawartości fagopiryny – proszę o komentarz.

Tą część pracy zamyka rozdział zawierający wnioski z przeprowadzonych badań.

Autorka sformułowała 16 wniosków podsumowujących badania zaprezentowane w pracy oraz 6 wniosków wskazujących na kierunki przyszłych badań. Zamieszczone wnioski są adekwatne do uzyskanych wyników.

Dodatkowego doprecyzowania moim zdaniem wymaga wniosek 8. Należałoby podać parametry ekstrakcji uzyskane w wyniku optymalizacji z zastosowaniem użytego w badaniach modułu.

### **Ocena poprawności redakcyjnej rozprawy**

Praca ma układ typowy dla tego typu opracowań. Jednakże podsumowując uwagi dotyczące poprawności redakcyjnej rozprawy należy zwrócić uwagę na następujące aspekty:

W mojej opinii należało połączyć rozdziały 2 i 3 (Hipotezy badawcze i Cel pracy).

Rozdział „Wyniki i dyskusja” powinien być zatytułowany „Wyniki badań” ponieważ dyskusja wyników zaprezentowana jest w kolejnym rozdziale.

Wszystkie tabele zawierające analizy statystyczne należało zamieścić w Aneksie z uwagi na obszerny zakres badań.

Powyższe uwagi nie umniejszają jednak wartości pracy ponieważ nie stanowią one o poważnych błędach w kwestii redakcji opracowania, a stanowią bardziej sugestie recenzenta.

### **Wniosek końcowy**

Wszystkie powyższe uwagi nie umniejszają jednak ogólnej wartości pracy, a lektura całości pozwala na pozytywną ocenę założeń i wartości merytorycznej dysertacji.

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Dagmary Poniewskiej jest interesującą i wartościową rozprawą naukową dotyczącą optymalizacji ekstrakcji inozytoli z nasion gryki oraz możliwości wykorzystania gryki do produkcji nowych produktów funkcjonalnych. Jest ona kompleksowym opracowaniem stanowiącym wartościowy przyczynek do istniejącego stanu wiedzy, zawiera również elementy nowatorskie. Na szczególne podkreślenie zasługuje aplikacyjna wartość pracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska jest oryginalnym i wartościowym osiągnięciem naukowym a przedstawione uwagi nie rzutują na jej wysoką wartość naukową. Rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, wymienione w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14.03. 2003 r. (Dz.U. Nr 65, poz. 595, art.13.1 z późn. zm.). Na tej

podstawie wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Dagmary Poniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Mieczysław Zlotek*